

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS**

CLARISSA LOUREIRO TONINI

**ATEROSCLEROSE E ENVELHECIMENTO – EFEITOS DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA,
SANGUE E AORTA**

**VITÓRIA
2013**

CLARISSA TONINI

**ATEROSCLEROSE E ENVELHECIMENTO – EFEITOS DO
ESTRESSE OXIDATIVO EM CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA,
SANGUE E AORTA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas, na área de Fisiologia Cardiovascular.

VITÓRIA
2013

**Dedico à Deus, minha família
e a todos aqueles que colaboraram
para o desenvolvimento deste estudo.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus por ter me concedido durante estes 6 anos (mestrado e doutorado) muita sabedoria e proteção. Gostaria de agradecer também a minha família: mãe, pai, irmão, sobrinho, tios, tias, primos, primas, avô e avó pelo apoio, carinho e compreensão em todos os momentos que estivemos juntos e também quando estive ausente. Obrigada de coração! Tenho que agradecer muito também ao Miguel pelo incentivo, amor e companheirismo nesta longa jornada. Muito obrigada, você é meu amigo e amor de verdade! Também devo muitos agradecimentos a minha irmã de coração, Bianca, pela sua amizade desde a época da graduação em Ciências Biológicas até agora, final do Doutorado! Longo caminho percorremos juntas, muitas histórias para contar... Sem você não eu teria chegado tão longe! Obrigada por tudo, amiga e irmã! Meus sinceros agradecimentos aos meus professores e orientadores, professores Vasquez e Silvana! Obrigada pela confiança investida em mim! Agradeço também meus colegas de laboratório, minhas amigas: Carol, Rovy, Paulets, Cics, Carlota, Cams, Cams bahiana, Fatinha, Lina, Thaís... Obrigada pela amizade de vocês! E por último, mas não menos importante, aos nossos camundongos.

*O homem traça os seus caminhos
mas somente Deus sabe qual ele irá percorrer (Provérbios, 16.9).*

RESUMO

Há décadas tem se estudado a relação entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o desenvolvimento da aterosclerose. Sabe-se que todo processo inflamatório envolvido na progressão da placa acarreta em aumento da produção de radicais livres. Além disso, o envelhecimento é um fator que agrava a doença aterosclerótica e também a produção de espécies reativas de oxigênio, provavelmente pela perda da capacidade antioxidante que faz o balanceamento regular das espécies reativas de oxigênio. O camundongo Apolipoproteína E deficiente é um modelo amplamente utilizado no estudo da aterosclerose, no qual há elevada hipercolesterolemia o que acarreta em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na medula óssea, sangue e aorta. O envelhecimento por sua vez também leva ao aumento da produção das espécies reativas de oxigênio, entretanto quando cumulado com a hipercolesterolemia, o resultado desse fenômeno é a ocorrência de maior produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, níveis elevados de fragmentação oxidativa do DNA e apoptose celular. Neste sentido, com maior destaque está a análise das células de medula óssea que apresentaram neste estudo alta produção de ânions superóxido e de radicais de peróxido de hidrogênio, ou seja, a fonte de produção de células sanguíneas e células tronco para todo o organismo, que comumente apresenta ambiente com baixa tensão de oxigênio, é afetada pelo desequilíbrio oxidativo causado pelo envelhecimento e pela aterosclerose. Ainda, corroborando com estes dados, a análise da fragmentação do DNA, pelo ensaio do cometa, das células de medula revelaram altos índices de fragmentação nos animais ateroscleróticos e idosos. Ainda, as células de sangue e aorta dos animais ateroscleróticos e idosos também apresentaram alta produção de ânion superóxido. Entretanto, encontramos baixa produção de peróxido de hidrogênio nas células endoteliais de todos os grupos, sugerindo uma possível modulação tecido-específica dos efeitos de enzimas antioxidantes. Além disso, observamos que não há aumento da produção de peróxido de hidrogênio nas células sanguíneas de animais C57 idosos, ao contrário das células mononucleares de medula óssea, no qual observamos aumento. Por fim, pode-se destacar que, de modo geral, a aterosclerose aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio assim como o envelhecimento, porém quando estes dois parâmetros são cumulados a tensão oxidativa é ainda maior. A análise da literatura científica sugere uma possível ativação da enzima NADPH oxidase, responsável pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, e *downregulation* de enzimas antioxidantes, que prejudica o balanceamento do estresse oxidativo nos tecidos analisados.

PALAVRAS-CHAVE: ATEROSCLEROSE, CAMUNDONGO APOE-KO, ENVELHECIMENTO, ESTRESSE OXIDATIVO.

ABSTRACT

The relationship between production of reactive oxygen species and the development of atherosclerosis has been studied for decades. It is known that all inflammatory processes involved in plaque progression leads to increased production of free radicals. Furthermore, aging is a factor that aggravates atherosclerotic disease and also reactive oxygen species production, probably by the loss of antioxidant capacity that makes regular balancing of reactive oxygen species. The Apolipoprotein E deficient mouse is a model widely used in the study of atherosclerosis, in which there is high hypercholesterolemia that results in increased production of reactive oxygen species in the bone marrow, blood and aorta cells. Aging in turn also leads to increased production of reactive oxygen species, however when combined with hypercholesterolemia, the result of this phenomenon is the occurrence of increased production of reactive oxygen species and thus high levels of oxidative DNA fragmentation and apoptosis. In this regard, most notably is the analysis of bone marrow cells, a source of blood and stem cells for all organism that commonly presents a low oxygen tension ambient, in which we showed high generation of superoxide radicals and hydrogen peroxide. Thus, bone marrow is affected by oxidative imbalance caused by aging and atherosclerosis. Still, corroborating these data, in the analysis of DNA fragmentation by comet assay, bone marrow cells showed high levels of fragmentation in atherosclerotic and aged animals. Still, blood and aorta cells from atherosclerotic and aged animals also showed high superoxide anion production. However, there are low hydrogen peroxide production in endothelial cells of all groups, suggesting a possible modulation of tissue-specific effects of antioxidant enzymes. Furthermore, we note that there is not increased production of hydrogen peroxide in blood cells from aged C57 animals, unlike bone marrow mononuclear cells, in which we observed an increase. Finally, it can be noted that, in general, atherosclerosis increases the production of reactive oxygen species as well as aging, but when these two parameters are combined oxidative stress is further increased. The analysis of scientific literature suggests a possible activation of NADPH oxidase enzyme, responsible for the increased production of reactive oxygen species, and downregulation of antioxidant enzymes, which affect the balance of oxidative stress in tissues.

KEYWORDS: ATHEROSCLEROSIS, APOE-DEFICIENT MOUSE, AGING, OXIDATIVE STRESS

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Dados referentes a óbitos no estado do Espírito santo.....	22
Gráfico 2 – Distribuição da população por grupos etários no Brasil.....	23
Gráfico 3 – Níveis comparativos de colesterol total entre os grupos.....	86
Gráfico 4 - Intensidade média da fluorescência de DHE nas células de medula óssea.....	91
Gráfico 5 - Intensidade média de fluorescência de DCF nas células de medula óssea.....	93
Gráfico 6 – Percentual de células em mononucleares em apoptose.....	95
Gráfico 7 - Score dos danos no DNA.....	98
Gráfico 8 - Intensidade média da fluorescência de DHE no sangue.....	99
Gráfico 9 - Intensidade média da fluorescência de DCF no sangue de animais.....	101
Gráfico 10 – Percentual de apoptose nas células sanguíneas.....	103
Gráfico 11 - Intensidade média da fluorescência de DHE células endoteliais de aorta.....	106
Gráfico 12 - Área de deposição lipídica das aortas em face coradas com Oil red-O.....	108
Gráfico 13 - Intensidade Média de fluorescência de DHE em cortes histológicos de aorta.....	111
Gráfico 14 - Intensidade média da fluorescência de DCF nas células endoteliais de aorta.....	112
Gráfico 15 - Porcentagem de apoptose celular nas células de aorta.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Locais de formação de placa aterosclerótica.....	25
Figura 2 – Formação de ERO na placa aterosclerótica.....	30
Figura 3 – Evolução da placa aterosclerótica.....	32
Figura 4 – Criação do modelo ApoE-KO.....	35
Figura 5 - Estresse Oxidativo.....	43
Figura 6 – Fontes endógenas e exógenas de ERO.....	44
Figura 7 – Participação das espécies reativas de oxigênio em diversas doenças.....	46
Figura 8 – Estrutura da NADPH oxidase.....	47
Figura 9 – Efeitos do estresse oxidativo: moderado e crônico.....	51
Figura 10 - Diferenças entre apoptose e necrose.....	53
Figura 11 – Coleta intracardíaca de sangue.....	62
Figura 12 – Isolamento de células da medula óssea.....	64
Figura 13 – Fração de células mononucleares.....	66
Figura 14 – Isolamento da artéria aorta.....	68
Figura 15 – Quadrantes da câmara de Neubauer.....	69
Figura 16 – Câmara de Neubauer.....	70
Figura 17 – Microscópio Ótico Invertido Canon.....	70
Figura 18 – Citômetro de Fluxo FACSCanto II.....	72
Figura 19 – FacsDiva BD Software.....	72
Figura 20 – Página de aquisição de dados do Diva.....	72
Figura 21 - CS&T – Cytometer Setup e Tracking Beads.....	73
Figura 22 – Dot plot típico de gate de células mononucleares de medula óssea.....	74
Figura 23 – Identificação de células endoteliais.....	75
Figura 24 - Marcação com Anexina-FITC-PI para análise de apoptose....	77
Figura 25 – Cuba vertical para etapa de lise do ensaio do cometa.....	81
Figura 26 – Eletroforese em cuba horizontal.....	81
Figura 27 - <i>Dot plots</i> ilustrativos de células de sangue, medula óssea e aorta.....	89
Figura 28 - Histogramas típicos de intensidade média de fluorescência de dihidroetídeo em células mononucleares de medula óssea.....	92
Figura 29 - Histogramas típicos de intensidade de DCF por citometria de fluxo nas células de medula óssea.....	94

Figura 30 – Dot plots típicos de células mononucleares em apoptose.....	96
Figura 31 - Fotos típicas da fragmentação do DNA de células da medula óssea.....	97
Figura 32 - Histogramas típicos de intensidade de DHE por citometria de fluxo nas células sanguíneas.....	100
Figura 33 - Histogramas típicos de intensidade de DCF por citometria de fluxo nas células sanguíneas.....	102
Figura 34 – Dot plots típicos de células sanguíneas em apoptose.....	104
Figura 35 - Identificação de células endoteliais.....	105
Figura 36 - Histogramas típicos de intensidade média de DHE nas células endoteliais de aorta.....	107
Figura 37 - Representação de típicos de aorta en face coradas com Oil Red-O.....	108
Figura 38 - Cortes histológicos de aorta corados com Oil red.....	109
Figura 39 - Cortes histológicos de aorta corados com DHE.....	110
Figura 40 - Histogramas típicos de intensidade de DCF por citometria de fluxo nas células endoteliais de aorta.....	113
Figura 41 - <i>Dot plots</i> típicos obtidos da análise de apoptose em células de aorta.....	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de glicose sanguínea.....	87
Tabela 2 – Percentual de células no Gate de CMN.....	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 BREVE RELATO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ENVELHECIMENTO NO BRASIL.....	21
1.2 ATEROSCLEROSE.....	23
1.2.1 Conceito.....	23
1.2.2 Aterogênese.....	25
1.2.3 Classificação das placas ateroscleróticas.....	32
1.2.4 O modelo ApoE-KO de aterosclerose.....	34
1.3 ENVELHECIMENTO.....	36
1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	42
1.5 APOPTOSE.....	52
2 OBJETIVOS	57
2.1 OBJETIVO GERAL.....	57
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
3 METODOLOGIA	59
3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	59
3.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL PLASMÁTICO.....	60
3.3 ANÁLISE DO NÍVEL DE GLICEMIA.....	60
3.4 HISTOLOGIA DE ARTÉRIA AORTA.....	61
3.5 PREPARO DA AORTA EN FACE PARA ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO LIPÍDICA.....	61
3.6 COLETA DO SANGUE.....	62
3.6.1 Lise do sangue	62
3.7 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	63
3.8 ISOLAMENTO DE CÉLULAS AÓRTICAS.....	66
3.9 QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	68
3.10 A CITOMETRIA DE FLUXO.....	71
3.10.1 Controle de qualidade da citometria de Fluxo	73
3.10.2 Funcionamento do Citômetro de Fluxo	74
3.11 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS.....	75
3.12 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E APOPTOSE (ANEXINA).....	76
3.13 MEDIDA DE ESTRESSE OXIDATIVO PELA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS CITOPLASMÁTICOS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (DHE E DCF).....	77

3.13.1 Análise de DHE em cortes histológicos de aorta.....	78
3.14 ENSAIO DO COMETA PARA ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA.....	79
4 RESULTADOS.....	86
4.1 NÍVEIS DE COLESTEROL PLASMÁTICO.....	86
4.2 NÍVEL DE GLICOSE NO SANGUE.....	87
4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR APÓS ISOLAMENTO E CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER.....	87
4.4 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	88
4.5 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO, APOPTOSE E DANO AO DNA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA.....	90
4.5.1 Porcentagem de Células Mononucleares no gate morfológico...90	
4.5.2 Intensidade Média de Fluorescência de Dihidroetídeo nas células mononucleares de medula óssea.....90	
4.5.3 Intensidade Média de Fluorescência de DCF-DA nas células mononucleares de medula óssea.....92	
4.5.4 Quantificação de Apoptose nas células mononucleares de medula óssea.....94	
4.5.5 Níveis de fragmentação do dna das células mononucleares de medula óssea pelo ensaio do cometa.....96	
4.6 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE DE CÉLULAS SANGUÍNEAS.....	98
4.6.1 Intensidade Média de Fluorescência de Dihidroetídeo nas células Sanguíneas.....98	
4.6.2 Intensidade Média de Fluorescência de DCF-DA nas células sanguíneas.....100	
4.6.3 Quantificação de Apoptose nas células Sanguíneas.....102	
4.7 QUANTIFICAÇÃO DA PLACA ATEROSCLERÓTICA, ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA.....	104
4.7.1 Identificação das células endoteliais de aorta.....104	
4.7.2 Intensidade média de fluorescência de dhe nas células endoteliais de aorta.....105	

4.7.3 Análise da área de deposição lipídica <i>en face</i> nas aortas coradas com oil red-O.....	108
4.7.4 Análise de cortes histológicos de Aortas corados com DHE e Oil Red-O.....	109
4.7.5 Intensidade média de fluorescência de DCF-DA nas células endoteliais de aorta.....	111
4.7.6 Quantificação de apoptose nas células endoteliais de aorta....	114
5 DISCUSSÃO.....	117
5.1 CAMUNDONGOS APOE-KO TÊM NÍVEIS ELEVADOS DE COLESTEROL, ENTRETANTO, SEM ALTERAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICOSE PLASMÁTICA.....	117
5.2 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA, SANGUE E AORTA DE CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS E C57.....	120
5.3 DANOS OXIDATIVOS AO DNA DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA.....	141
6 CONCLUSÃO.....	148
7 ANEXO.....	150
7.1 ARTIGO PUBLICADO REFERENTE A TESE.....	151
REFERENCIAS.....	153

LISTA DE ABREVIACÕES

ERO – Espécies reativas de Oxigênio
DCV – Doenças Cardiovasculares
OMS – Organização Mundial de Saúde
DATASUS – Dados do Sistema único de saúde
SESA – Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo
RIPSA – Rede Interagencial de Informações para a Saúde
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
IDL – Lipoproteína de densidade intermediária
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade
HDL – Lipoproteína de alta densidade
LDLox – Lipoproteína de baixa densidade oxidada
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
VCAM – Molécula de adesão vascular
PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas (platelet derived growth factor)
IL6 – Interleucina 6
FGF – Fator de crescimento de fibroblastos (fibroblast growth factor)
TNF- α - Fator de necrose tumoral α (*tumoral necrosis factor- α*)
SMC – células de músculo liso (*smooth muscle cell*)
RNA – Ácido ribonucleico
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
ATP – Adenosina Trifosfato
UV – Ultravioleta
O₂⁻ - Ânion superóxido
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
SOD – Enzima superóxido dismutase
GPx – Glutathione peroxidase
CAT – Catalase
OH - Hidroxila
NO – Óxido nítrico
ONOO⁻ Nitrito
SOD Cu/Zn – Enzima superóxido dismutase tipo Cobre Zinco
SOD Mn – Enzima superóxido dismutase tipo Manganês
ApoE-KO – Apolipoproteína E deficiente
CTNBio - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
APS - American Physiological Society

CEUA-EMESCAM - Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória

DHE – Dihidroetídeo

DCF – Dicloro-fluoresceína

RPM – Rotações por minutos

PBS – Solução tampão fosfato salina (*Phosphate Buffered Salin*)

OCT – Gel congelante (Optimum cutting temperature)

FBS – Soro Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)

DMEM – Meio de Cultura (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

PBS-iFBS – Soro fetal bovino inativado

HBSS - *Hank's Balanced Salt Solution*

CS&T - *Cytometer Setup and Tracking*

SIT - *Sample Injection Tube*

FSC – Forward scatter channel (Tamanho)

SSC – Side scatter channel (Complexidade interna)

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

APC – Alofocianina

PI – Iodeto de propídeo

H₂DCFDA – diclorodihidrofluoresceína

DHE – Hidroetidina ou Dihidroetídeo

DCF - Diclorofluoresceína

ROO[•] - radical peroxil

SCG – Single cell gel

NMA – normal melting agarose

LMP – Low melting point

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (Ethylenediamine tetraacetic acid)

EPM – Erro padrão da média

CMN – Células mononucleares

IMF – Intensidade média de fluorescência

MDA – Malondialdeído

LOOH - Hidroperóxidos lipídicos

IL-1 – Interleucina 1

CoQH₂ – Coenzima QH₂

GR – Glutathiona redutase

GST - Glutathiona-s-transferase

NFκB - Fator nuclear kappa beta

EPC – Células progenitoras endoteliais

GCSF – Fator estimulante de colônia de granulócitos (*Granulocyte colony-stimulating factor*)

TUNEL - Terminal deoxinucleotidil transferase UracilNick End Labeling

1 INTRODUÇÃO

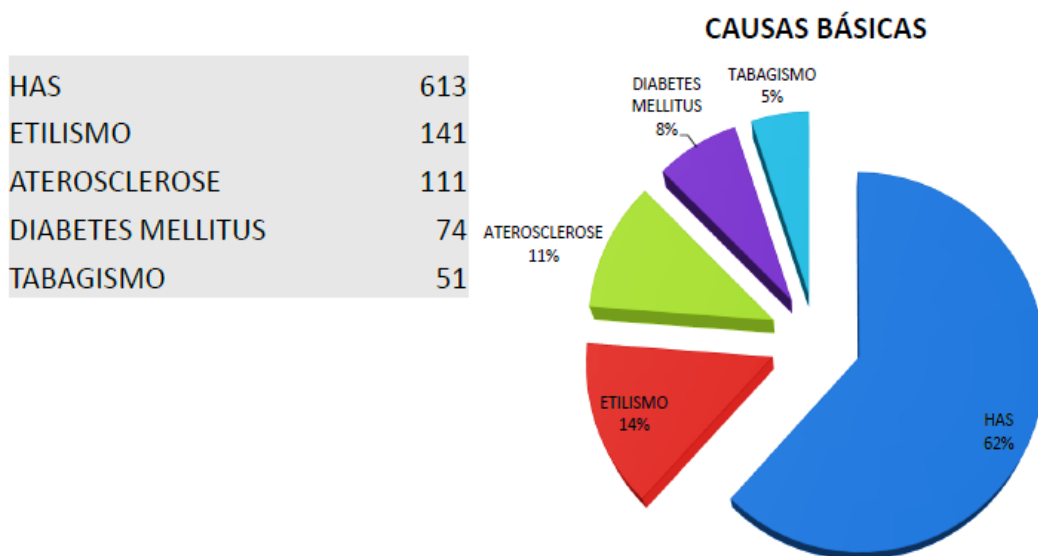
1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE RELATO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE DOENÇAS CARDIOVASCULARES E ENVELHECIMENTO NO BRASIL

As doenças cardiovasculares (DCV) têm ocupado, mundialmente, um papel de destaque entre as causas de morte. No início do século XX as doenças cardiovasculares eram responsáveis por aproximadamente 10% das mortes em todo o mundo. Entretanto, no início do século XXI, essas doenças representam cerca de 50% dos óbitos registrados nos países desenvolvidos e 25% nos países em desenvolvimento (IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias, 2007). Segundo o panorama estatístico da Organização Mundial de Saúde (OMS), durante o ano de 2008 17 milhões de pessoas morreram em consequência de complicações cardiovasculares. Entretanto, até 2030 este número se elevará mais ainda podendo alcançar 25 milhões de óbitos (OMS, 2012).

Dados da Organização Pan Americana de Saúde revelaram que durante o ano de 2011, 62,7% das mortes ocorridas no Brasil foram causadas por doenças cardiovasculares. Já no estado do Espírito Santo, dados do DATASUS (2011) revelam que a taxa de mortalidade específica por doenças do aparelho circulatório correspondeu a 63,6% ficando atrás apenas na região Sudeste do Rio de Janeiro e São Paulo, que apresentaram 72,2% e 66%, respectivamente. Além disso, é importante destacar que 45% dos óbitos registrados no ano de 2010 são de pessoas idosas, ou seja, com mais de 60 anos de idade (SESA, 2010), que já chegam à proporção de 10,4% da população no estado do Espírito Santo (DATASUS, 2011).

Dados recentes do serviço de verificação de óbitos (2011) da Secretaria de saúde do estado do Espírito Santo revelaram que no ano de 2011, 111 pessoas morreram devido a aterosclerose, o que corresponde a 11% do total de óbitos registrados, conforme pode-se observar no gráfico a baixo (Figura 1).



FONTE: SVO/GEVS/SESA

Figura 1: Dados referentes as causas básicas de óbitos relacionados com a doença cardiovascular no ano de 2011 (SESA, 2011).

O Brasil está passando por uma transição demográfica profunda provocada, principalmente, pela queda da taxa de fecundidade iniciada em meados dos anos 60 e generalizada em todas as regiões brasileiras e estratos sociais. O aumento da longevidade e a redução da mortalidade infantil também contribuem para a mudança do padrão demográfico, além de determinantes como a intensa urbanização e a mudança do papel econômico da mulher. O processo de Transição da Estrutura Etária durante esse período levará, ao longo das próximas quatro décadas, ao surgimento de uma população de perfil envelhecido e com um ritmo de crescimento baixíssimo. Entre os principais desafios, sem dúvida, está a geração de novas demandas para o sistema de saúde (RIPSA, 2009).

As mudanças mais notáveis ocorrerão nas faixas de idade extremas. Os menores de 15 anos perderão representatividade, enquanto o peso relativo dos maiores de 65 anos será crescente (Figura 2), passando de 5,5%, em 2000, a 10,7%, em 2025, e a 19,4%, em 2050. O Índice de Envelhecimento coloca o Brasil, nas próximas décadas, entre os países com mais acentuado ritmo de envelhecimento da população. Em 2025, para cada conjunto de 100 menores de 15 anos, haverá 46 idosos. Finalmente, em 2050, o número de pessoas idosas ultrapassará o de menores de 15 anos (RIPSA, 2009).

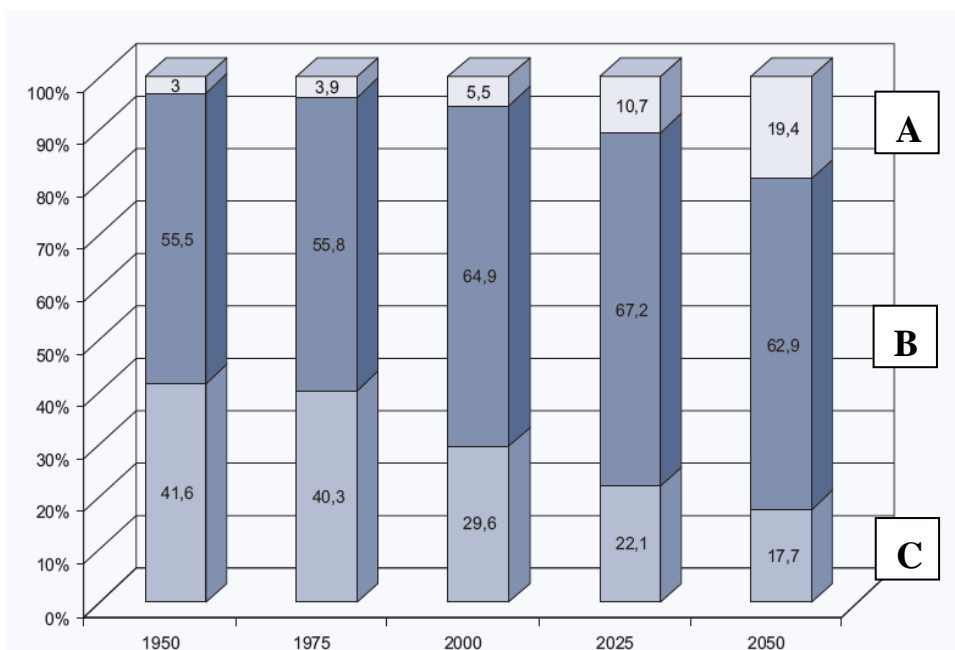


Figura 2: Brasil. Distribuição da população por grandes grupos etários (%) no período de 1950-2050. A) Faixa etária >60 anos B) 14-64 anos C) 0-14 anos. Fonte: adaptado de IBGE (2006).

Pode-se extrair das informações epidemiológicas obtidas a noção de que há no Brasil e no mundo uma expressiva quantidade de mortes provocada pelas doenças cardiovasculares, o que demanda um gasto efetivo de verbas federais, além disso, há de fato uma curva de envelhecimento crescente o que colabora diretamente para o agravamento das doenças cardiovasculares, pois já se sabe que estão intimamente relacionados (RIPSA, 2009).

1.2 ATEROSCLEROSE

1.2.1 Conceito

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (IV diretrizes brasileiras de dislipidemias, 2007).

A palavra aterosclerose deriva do grego *atero*, que significa caldo ou pasta, e *esclerose*, que equivale a endurecimento (Gottlieb, 2005). O primeiro a relacionar a doença aterosclerótica coronária com os níveis sanguíneos de colesterol foi Muller, na década de 30. Algum tempo depois, Keys e colaboradores, na década de 50, chamaram a atenção para a grande diversidade de frequência da doença aterosclerótica coronária entre países, postulando que ela fosse devida às diferenças na ingestão de gordura existentes entre as populações. Nessa mesma década, Albrink e Mann foram os primeiros a sugerir a ligação dos triglicérides com o infarto do miocárdio (Bertolami, 2000).

A primeira descrição da aterosclerose foi dada na segunda metade do século XIX, por Virchow que propôs que as lesões seriam decorrentes da “insudação” de plasma para a camada íntima das artérias resultando em um processo proliferativo localizado (Giannini, 2000).

A aterosclerose é uma doença em que múltiplos fatores contribuem para a degeneração da parede arterial, sendo evidente que a intensidade e duração das agressões determinam a severidade das alterações. Muitos fatores têm sido identificados como influenciadores da progressão da aterosclerose, principalmente, idade, sexo, hereditariedade, composição da dieta, dislipidemia, tabagismo, atividade física, obesidade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus, hipertrofia ventricular esquerda e fatores psicossociais (Alencar, 2000). Apesar de o acúmulo lipídico ser um processo progressivo, as lesões alcançam um patamar crítico entre 40-60 anos de idade (Robbins & Cotran, 2008).

Altas concentrações sanguíneas de LDL constituem o principal fator de risco, sendo condição essencial para sua manifestação clínica (Steinberg, 2002). Apesar de a hipercolesterolemia parecer ser o fator-chave no desenvolvimento da doença, pesquisas recentes indicam que a inflamação é um dos principais fatores moduladores da aterogênese (Binder *et al.*, 2002; Libby *et al.*, 2002) sendo principalmente evidenciada pela presença de um elevado número de células imunes desde os estágios iniciais da doença e consequente produção de moléculas efetoras que aceleram ou retardam a progressão das lesões

(Hansson, 2005; Luque, 2010).

Embora possa ser encontrada em qualquer artéria de grande ou médio calibre, a doença é mais comum na aorta, especialmente na porção abdominal e nos seus ramos principais, como artérias coronárias, carótidas, ilíacas, femorais e também é frequente nos óstios das artérias renais e mesentéricas, conforme pode ser observado na Figura 3 (Bogliolo, 2006).

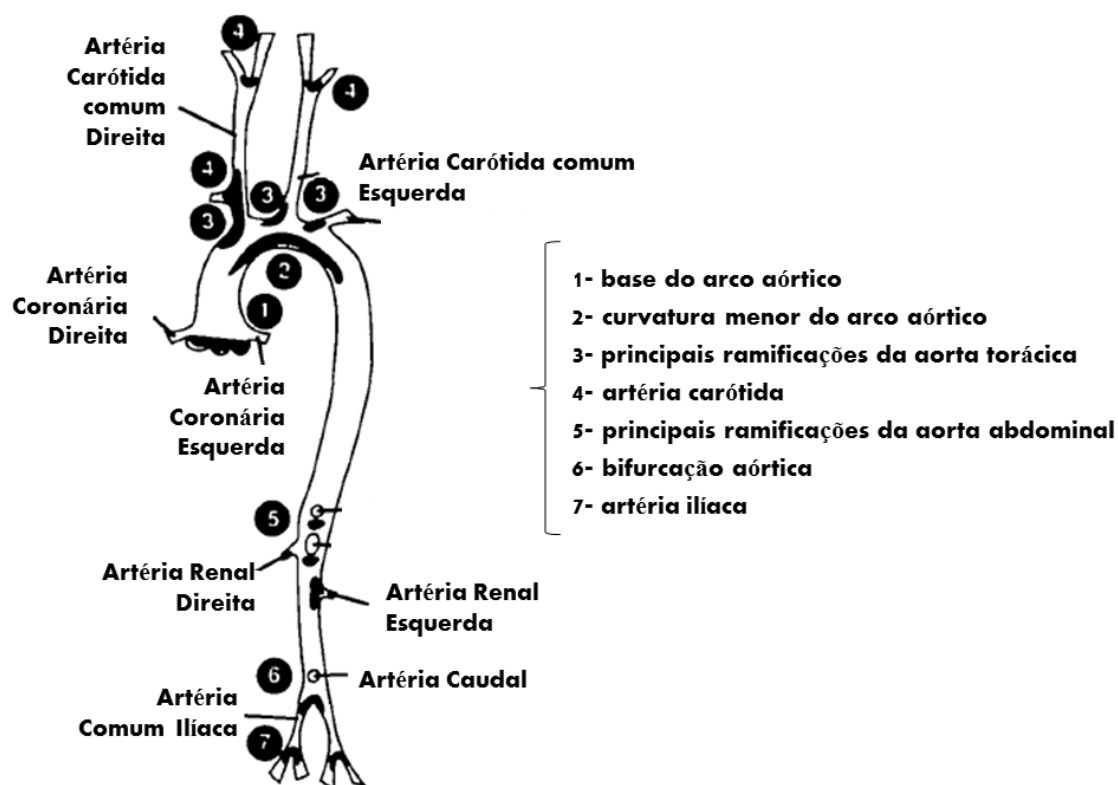


Figura 3: Representação da artéria aorta no camundongo ApoE-KO. Locais prováveis de desenvolvimento de placas ateroscleróticas estão indicados em cor preta (Adaptado de Nakashima *et al.*, 1994).

A formação da placa aterosclerótica inicia-se com a agressão ao endotélio vascular devido a diversos fatores de risco como elevação de lipoproteínas aterogênicas (LDL, IDL, VLDL, remanescentes de quilomícrons), hipertensão arterial ou tabagismo. Como consequência, a disfunção endotelial aumenta a permeabilidade da camada íntima arterial às lipoproteínas plasmáticas favorecendo a retenção das mesmas no espaço subendotelial. Retidas, as partículas de LDL sofrem oxidação, causando a exposição de diversos neoepítomos, tornando-as imunogênicas. O depósito de lipoproteínas na parede arterial, processo-chave no início da aterogênese, ocorre de maneira

proporcional à concentração dessas lipoproteínas no plasma (IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose, 2007).

1.2.2 Aterogênese

Os lipídeos são caracterizados pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e insolubilidade em água. Os lipídeos mais importantes, do ponto de vista fisiológico e clínico, são os ácidos graxos, os triglicerídeos, os fosfolipídios e o colesterol (Champe, 2007; Jascolka, 2010).

Devido à natureza hidrofóbica dos lipídeos, seu mecanismo de transporte e distribuição no plasma não seria possível sem alguma forma de adaptação hidrofílica. Assim, as lipoproteínas são responsáveis pelo transporte de lipídeos no sangue, especialmente colesterol e triglicerídeos, cujo metabolismo está intimamente relacionado com a iniciação e progressão da aterosclerose (Frassen *et al.*, 2008; Rader & Daugherty, 2008; Jascolka, 2010).

De acordo com sua origem, composição, densidade e tamanho, as lipoproteínas podem ser classificadas em: quilomícrons (QM), lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de densidade intermediária (IDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Rader & Wilson, 1995). As lipoproteínas mais abundantes no plasma humano são as LDLs e HDLs (Rader & Daugherty, 2008).

A dislipidemia, caracterizada por níveis elevados de LDL e reduzidos de HDL circulantes, é um pré-requisito essencial para o início da lesão e progressão da doença aterosclerótica (Binder *et al.*, 2002; Alvarez-Leite *et al.*, 2003).

Antes de adentrarmos ao papel da LDL na iniciação da aterosclerose é importante ressaltar que o dano vascular causado na aterosclerose pode ser resultado da interação de vários fatores, inicialmente o que ocorre é o dano endotelial.

O endotélio é constituído por uma monocamada de células e funciona, não só como uma barreira seletiva permeável entre o sangue e os tecidos, mas também, como um importante regulador do tônus vascular, controlando a trombose, a inflamação, a coagulação e a regeneração e a permeabilidade vascular. Da alteração de qualquer uma destas propriedades resulta a disfunção endotelial, um dos elementos fundamentais em todo o processo da aterogênese (Ross, 1993).

Um endotélio considerado saudável resiste por tempo prolongado ao contato com leucócitos do sangue, produz vasodilatadores endógenos, combate a trombose, favorece a fibrinólise e expressa enzimas, como por exemplo, a superóxido dismutase que faz a degradação das espécies reativas de oxigênio (ERO) (Libby, 2010).

Logo, o endotélio é um dos principais mantenedores do tônus vasomotor. Ele é capaz de produzir grande variedade de substâncias que podem agir de forma autócrina, parácrina e endócrina (Esper *et al.*, 2006; Ferraz, 2008). Entretanto, as células endoteliais podem tornar-se disfuncionais quando expostas a diversos fatores, como por exemplo, a um fluxo turbilhonar oposto ao fluxo laminar normal (denominado de *shear stress*), e também quando exposto a fatores pró-aterogênicos como lipoproteínas modificadas (LDL oxidadas) ou citocinas pró-inflamatórias (Libby, 2010), homocisteína, infecção, espécies reativas de oxigênio (Hennig & Chow, 1987) e de nitrogênio produzidas pelas próprias células endoteliais ou células de músculo liso (Hennig & Chow, 1988; Ross, 1999). Além disso, os ácidos graxos, além de inibir a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), estimulam a produção de ânion superóxido por células endoteliais e vasculares via ativação da NADPH oxidase, contribuindo para a diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico e, dessa forma, para o desenvolvimento de disfunção endotelial (Carvalho *et al.*, 2006).

Todo este processo é agravado em regiões onde há ramificações e curvaturas acentuadas nas artérias, nas quais ocorre aumento da força de cisalhamento (*shear stress*) e da turbulência do fluxo. Estes são os locais mais propensos à lesão endotelial, e logo à formação da placa aterosclerótica (Hansson & Libby, 2006).

De acordo com Steinberg (2002), a inflamação é a resposta a um agente que desestabiliza a homeostase do local envolvido. A hipótese oxidativa da aterosclerose, segundo Witztum (1993), sugere que o processo aterosclerótico possa ser iniciado por danos no endotélio vascular, produzidos por modificações oxidativas da LDL. Esta injúria leva a alterações do endotélio que desencadeiam alterações celulares com monócitos, plaquetas, células musculares lisas e linfócitos, iniciando a lesão aterosclerótica (Ross, 1999).

O primeiro passo no desenvolvimento da aterosclerose é a retenção de LDLs na parede arterial. Este processo inicia-se quando há níveis elevados dessa lipoproteína na corrente sanguínea (hipercolesterolemia), o que facilita sua migração por diapedese através das células endoteliais. Uma vez retida no espaço subendotelial, a LDL poderá sofrer oxidação por ERO's produzidas por células endoteliais, macrófagos residentes e células musculares lisas, modificando sua estrutura (Steffens & Mach, 2004), formando a LDL oxidada (LDLox) (Jacolska, 2007). Portanto, os maiores responsáveis são os macrófagos que secretam espécies reativas de oxigênio causando a oxidação da fração proteica da LDL, originando a LDL altamente oxidada (Berliner *et al.*, 1995; Augusti, 2010).

Em suma, sob a ação de ERO, a LDL transforma-se em LDL oxidada. Suas principais propriedades são: (1) permanece mais tempo na circulação e penetra mais facilmente na íntima das artérias; (2) é rapidamente fagocitada por macrófagos através dos receptores *scavengers*. Como a degradação da LDL oxidada é mais difícil, os macrófagos transformam-se em células espumosas; (3) exerce quimiotaxia para leucócitos e induz a síntese de moléculas de adesão na superfície endotelial, facilitando a aderência de monócitos; (4) é citotóxica para células endoteliais; (5) estimula a liberação de fatores de crescimento para células musculares lisas; (6) é imunogênica, induzindo a produção de anticorpos (Bogliolo, 2006).

Voltando a aterogênese, o aumento da permeabilidade do endotélio facilita o acúmulo das LDL na matriz subendotelial. Aí, estão sujeitas a várias modificações, incluindo formação de complexos insolúveis por interação com

células vasculares e macromoléculas (proteoglicanos, colágeno e elastina) e modificação oxidativa, sendo subsequentemente captadas por macrófagos (Steinberg *et al.*, 1989).

O LDL aprisionado sofre oxidação, provavelmente pela ativação do complexo NADPH oxidase dos macrófagos, e torna-se imunogênico causando assim liberação de fatores inflamatórios. Ocorre aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial que resulta no recrutamento de mais leucócitos, principalmente os da linhagem mononuclear monócitos e linfócitos, que são atraídos para o local da formação da placa. (Libby, 2002; Paoletti *et al.*, 2004).

A seguir, moléculas de adesão na superfície das células endoteliais capturam mais leucócitos sanguíneos. Dentre os principais marcadores de ativação do endotélio está a molécula de adesão das células vasculares tipo 1 (VCAM-1), nas quais os leucócitos sanguíneos aderem (Libby, 2010). Uma vez aderidos, os leucócitos migram para a camada íntima da artéria, precisamente os monócitos, já maturados, se transformam em macrófagos que acumulam lipídios em seu interior, como podemos observar na Figura 4 a seguir (Libby, 2009).

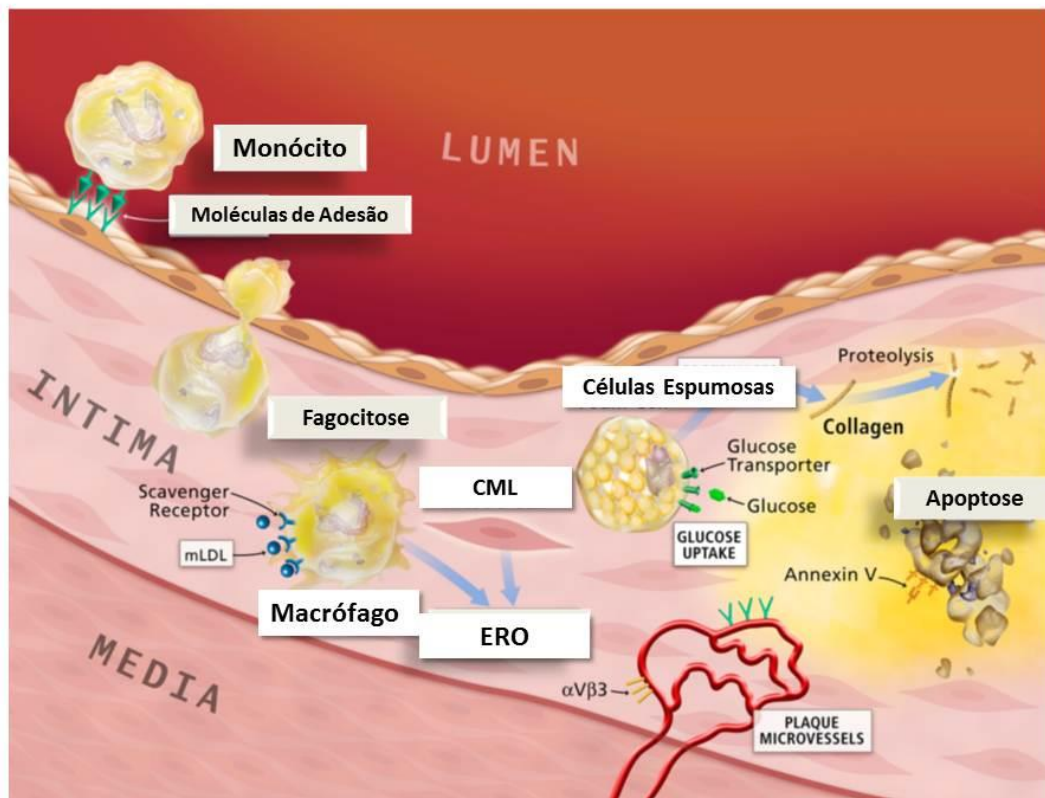


Figura 4: Formação de espécies reativas de oxigênio na placa aterosclerótica. A figura mostra a entrada de monócitos na íntima arterial, sua posterior transformação em macrófagos que fagocitam moléculas de LDL oxidada, dando origem às células espumosas. Há destaque para produção de ERO no interior da placa pelos macrófagos e células musculares lisas. Em seguida, a figura mostra que durante o desenvolvimento da placa também ocorre apoptose. Figura modificada de Libby, 2010.

Na íntima os macrófagos maduros, via receptores *scavengers*, fagocitam lipídeos oxidados. (Swirski, 2007). A estrutura formada por macrófagos com LDL oxidado é chamada de células espumosas, que são componentes das estrias gordurosas e caracterizam a lesão inicial da aterosclerose. (Libby, 2002; IV Diretriz Brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose, 2007; Paoletti *et al.*, 2004).

A modificação que ocorre das estrias gordurosas para lesões fibrosas mais complexas caracteriza-se pela migração das células musculares lisas da camada média da parede arterial para o espaço subendotelial, seguida da sua proliferação e produção de uma matriz extracelular rica em colágeno, que em

conjunto com as células musculares lisas formam uma capa fibrosa. Estas células podem captar lipoproteínas modificadas, contribuindo igualmente para a formação de células esponjosas. As citocinas e fatores de crescimento secretados pelos macrófagos, nomeadamente, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, *platelet derived growth factor*), o fator de crescimento dos fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α , *tumoral necrosis factor- α*) são importantes para a migração e proliferação das células musculares lisas e para a produção da matriz extracelular (Ross, 1993). A partir deste estágio a placa passa a ser considerada ateromatosa (Libby, 2002).

A morte de um grande número de células espumosas resulta na formação de um centro necrótico rico em colesterol que, posteriormente, se torna envolto por uma capa fibrosa constituída de células musculares lisas e proteínas de matriz extracelular, principalmente colágeno (Jonasson *et al.*, 1986), secretadas por essas células (Li & Glass, 2002). Com o tempo, as placas se modificam e tornam-se maduras com características de estrutura mais complexa e heterogênea, com até mesmo deposição de cálcio (mineralização) (Binder *et al.*, 2002; Luque, 2010).

Além disso, o centro necrótico e as áreas circundantes são também ricos em macrófagos que secretam metaloproteinases, tais como colagenases e elastases que podem degradar a matriz extracelular da capa fibrosa (Galis *et al.*, 1994; Mach *et al.*, 1997). A ruptura da capa fibrosa expõe o conteúdo do centro necrótico e os lipídeos que constituem a lesão, à corrente sanguínea, iniciando-se a coagulação com o recrutamento de plaquetas e, posterior formação de trombo, como pode ser observado na figura 5 (Schonbeck *et al.*, 2000). O trombo pode obstruir parcial ou totalmente o vaso sanguíneo e é a principal causa de eventos clínicos coronários agudos (Brito, 2007).

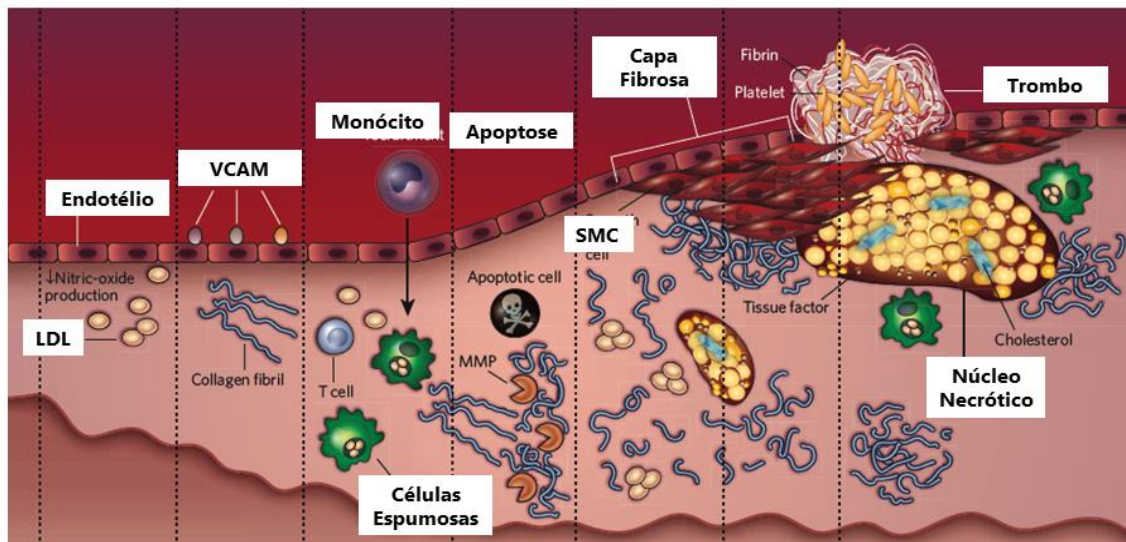


Figura 5: Evolução da placa aterosclerótica, desde a entrada de LDL na camada íntima, expressão de moléculas de adesão que atraem monócitos, formação de células espumosas, apoptose e formação do núcleo necrótico e trombo (modificada de Fayad, 2009).

1.2.4 O modelo ApoE-KO de aterosclerose

O camundongo knockout para apolipoproteína E foi desenvolvido para representar um modelo de estudo da aterosclerose semelhante à de humanos. Em 1992, dois laboratórios produziram simultaneamente o modelo de hipercolesterolemia (Plump *et al.*, 1992; Piedrahita *et al.*, 1992).

A apolipoproteína E é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 34 KDa, e tem a função de retirar do plasma as VLDL e IDL via receptor de LDL. Além disso, é sintetizada primariamente no fígado, mas também pode ser produzida em vários tecidos, como por exemplo, cérebro e macrófagos. Pode ser encontrada no plasma, mas se localiza principalmente nas VLDL, IDL e HDL respectivamente (Mahley, 1988; Zhang *et al.*, 1992; Plump *et al.*, 1992; Breslow, 1996; Vasquez *et al.*, 2012; Meyrelles *et al.*, 2012).

Para produzir o camundongo ApoE-KO, o gene que codifica a apolipoproteína E é inativado através de recombinação homóloga, na qual as células tronco embrionárias modificadas são inseridas em blastômeros de camundongos C57

receptores. A partir disso, são geradas quimeras, ou seja, ApoE positivos e negativos no mesmo animal, conforme observamos na figura 6. Através de cruzamentos entre as quimeras e camundongo selvagem, 25% dos filhotes gerados serão ApoE-KO, ou seja, apresentam elevados níveis de VLDL no plasma (Plump *et al.*, 1992).

Dentre os modelos gerados via manipulação genética, o camundongo ApoE-KO é considerado o mais relevante por desenvolver espontaneamente hipercolesterolemia e lesões arteriais semelhantes às humanas (Vasquez *et al.*, 2012).

No camundongo ApoE-KO, a maior parte da fração de colesterol plasmático é composta de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de densidade intermediária (IDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Este perfil é agravado quando se utiliza uma dieta do tipo Western. Em uma dieta normal, o ApoE-KO exibe aumento de colesterol total (~8 vezes), triglicerídeos (1,7 vezes), VLDL+IDL (~18 vezes) e LDL (14 vezes) quando comparado com o camundongo controle C57 (Vasquez *et al.*, 2012).

Portanto, sem a apolipoproteína E, o modelo apresenta altos níveis de colesterol plasmáticos. Quando esses animais são alimentados com dieta comercial normocolesterolêmica a colesterolemia total é maior que 500mg/dl, constituindo-se principalmente de VLDL e frações de quilomícrons remanescentes. Com a dieta hipercolesterolêmica, pode apresentar colesterol total em torno de 1000 a 2000mg/dl (Porto, 2011).

Estudos histopatológicos da progressão da placa aterosclerótica revelaram que os primeiros sinais de lesão aparecem por volta de 6-8 semanas de idade, indicados pela adesão de monócitos às células endoteliais (Nakashima *et al.*, 1994; Coleman *et al.*, 2006). Com 8-10 semanas, lesões contendo células espumosas e células musculares lisas são perceptíveis e a formação de capa fibrosa já é possível ser observada com 15-20 semanas de idade (Plump *et al.*, 1992; Nakashima *et al.*, 1994; Meir & Leitersdorf, 2004; Coleman *et al.*, 2006).

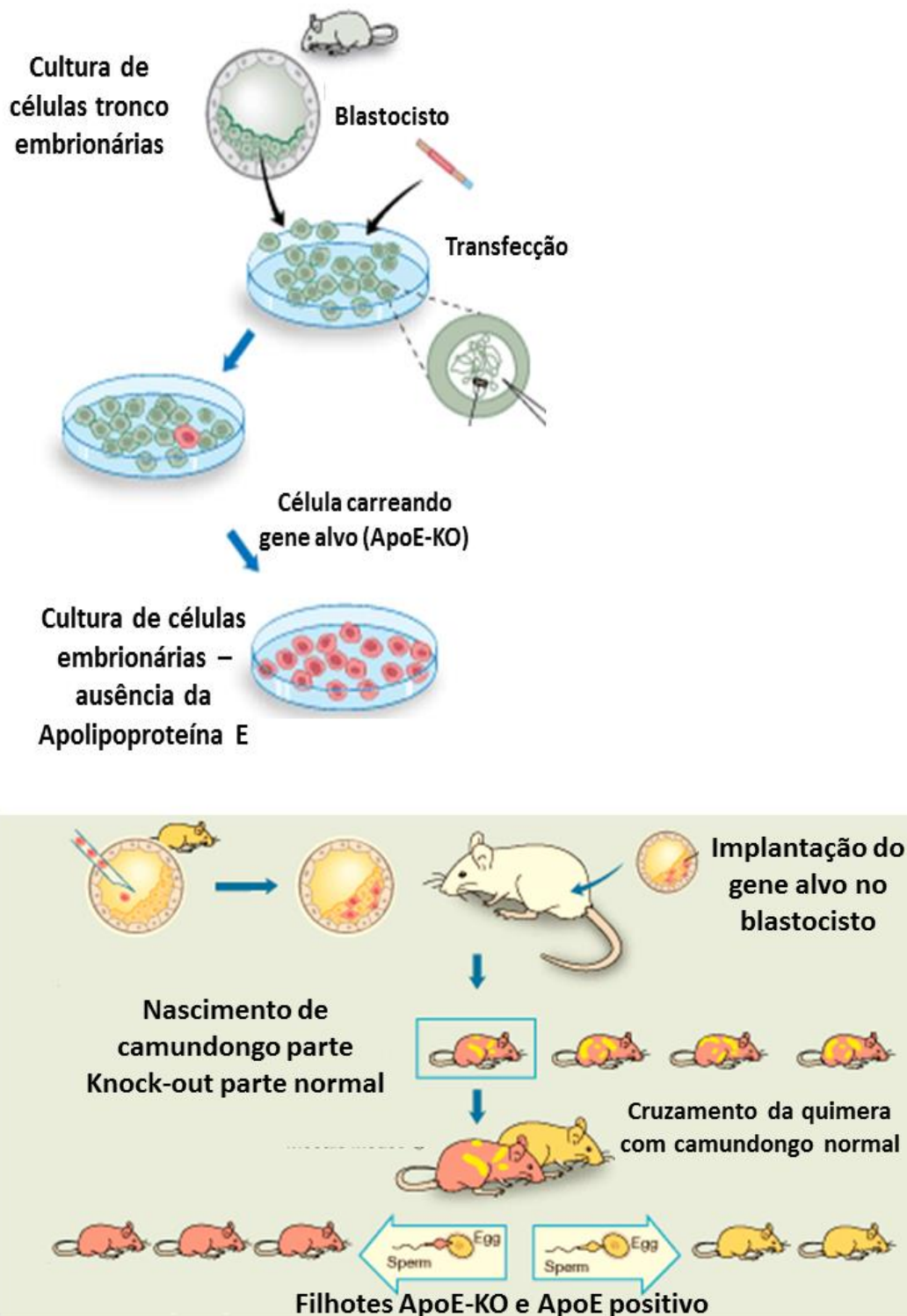


Figura 6: Criação do modelo ApoE-KO (Adaptado de www.nobelprize.com). A figura mostra a transfecção com o gene alvo de ApoE knockout cultivado em células tronco embrionárias. A seguir, as células contendo o gene alvo são inseridas em blastocistos de um camundongo receptor para dar origem ao filhote quimera. Ocorre o cruzamento da quimera com camundongo selvagem que dá origem aos filhotes ApoE^{-/-} e ApoE^{+/+}.

1.3 ENVELHECIMENTO

A aterosclerose é, por excelência, uma doença relacionada ao envelhecimento e a senescência celular (Wang & Bennett, 2012). O envelhecimento é um processo biológico, universal, dinâmico e progressivo, no qual ocorrem modificações morfológicas, funcionais e bioquímicas que reduzem a capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, afetando sua integridade e permitindo o surgimento das doenças crônicas, com impacto sobre a saúde e a qualidade de vida (Hayflick, 2007; Silva & Ferrari, 2011).

O crescimento da população idosa brasileira é um fato. Na verdade, este fenômeno é mundial e típico de países em desenvolvimento. De acordo com o IBGE, a esperança de vida ao nascer em 1940 era de 40,5 anos, aumentando para 70,4 anos em 2007, de modo que a população de idosos atinge cerca de 15 milhões de pessoas (Ewers, 2008; Silva & Ferrari, 2011). Além disso, segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2025, o Brasil terá a sexta população de idosos do mundo, aproximadamente 32 milhões de pessoas com mais de 60 anos de idade (Nascimento, 2011).

Portanto, a proporção de pessoas com mais de 60 anos de idade vem apresentando tendência ascendente, em correspondência com a redução dos níveis de fecundidade e o aumento da esperança de vida ao nascer (RIPSA, 2002). Diante disso os estudos que envolvem envelhecimento são importantes na medida em que auxiliam a busca por melhores tratamentos e prevenção de doenças que prevalecem neste patamar de vida, como a aterosclerose.

O envelhecimento dos vasos sanguíneos é caracterizado por número reduzido de células musculares lisas, aumento da deposição de colágeno e fraturas nas lâminas de elastinas o que acaba acarretando em dilatação dos vasos e aumento do lúmen (Zieman & Kass, 2004).

A aterosclerose associada ao envelhecimento causa aumento de marcadores de senescência celular, aumento da propensão a apoptose, elevado percentual de danos ao DNA e extensivo encurtamento dos telômeros. Tudo isto pode ser detectado em células de placa aterosclerótica (Wang & Bennett, 2012).

Diante disto, cabe ressaltar que existem dois processos distintos: o envelhecimento e a senescência. Até este momento, o que foi relatado se refere ao envelhecimento, passamos agora a apresentar o conceito de senescência, que em muitos trabalhos é apresentado como se envelhecimento fosse e que não está correto, pois não são sinônimos.

Quando células de tecidos normais de mamíferos são cultivadas em condições padronizadas, elas comumente podem ser expandidas por somente um número limitado de ciclos de divisão – cerca de 50 vezes para células típicas derivadas de humanos. Logo após, as células param de se dividir até que finalmente morrem – este processo é denominado de senescência celular (Alberts, 2002).

Fibroblastos retirados de um feto humano, por exemplo, sofrerão cerca de 50 duplicações quando cultivadas em um meio de cultura padrão. No final deste período, a proliferação diminui e finalmente para, logo as células entram em G_0 e daí nunca saem. Células semelhantes retiradas de um indivíduo de 40 anos de idade param de se dividir após 40 duplicações aproximadamente, enquanto células de uma pessoa de 80 anos cessam após 30 duplicações (Alberts, 2002). Este processo natural é denominado senescência celular.

Um estudo pioneiro foi conduzido em 1960, no qual Leonard Hayflick fez relatos de que a cultura de fibroblastos humanos retirados de tecido pulmonar embrionário cessava a replicação após um determinado número de divisões celulares. Este número máximo de divisões celulares foi denominado de limite de Hayflick, muito utilizado hoje para designar a senescência celular (Hayflick & Moorhead, 1961; Ogrunc & fagagna, 2011). Desta forma, a morte da cultura de células humanas normais não se deve a algumas causas triviais, que envolvem os componentes ou condições do meio de cultura, mas é antes uma consequência das características genéticas das próprias células (Mota *et al.*, 2004).

A consistência dos resultados obtidos em culturas de células levou os pesquisadores a considerar que a longevidade é determinada geneticamente,

uma vez que a célula tem uma capacidade de proliferação predefinida, isto é, o número de replicações é limitado (Mota *et al.*, 2004).

A hipótese de senescência celular propõe que a acumulação progressiva de células senescentes contribui para, mas não exclusivamente, fazer com que ocorra o envelhecimento do tecido. Logo, a senescência é um bloqueio permanente da divisão mitótica das células (Cox, 2007).

Agora podemos diferenciar envelhecimento e senescência. O primeiro pode ser considerado como gênero e o segundo espécie deste. Logo, podemos relacionar envelhecimento a um processo macro, no qual se observa gradualmente a diminuição das funções normais do organismo, como um todo. Já a senescência está relacionada a um processo micro, no qual o foco é a célula e a cessação da mitose. Logo, o envelhecimento biológico é um processo complexo caracterizado por diferenças espécie-específicas bem como tecido-específicas e por mecanismos de mudanças moleculares e fisiológicas relacionadas à idade. Evidências têm sido obtidas de que o envelhecimento biológico abrange diversos parâmetros intimamente relacionados, como: taxa metabólica, ingestão calórica, genética, estilo de vida e fatores ambientais (Schoneich, 1999; Costa, 2006).

Portanto, o envelhecimento é um processo biológico inevitável que pode ser caracterizado por declínio geral das funções fisiológicas, e que é contrabalançado por mecanismos de reparo e fatores de manutenção que contribuem para a longevidade do organismo. Assim, Beckman e Ames (1998) também definiram o envelhecimento como um fenômeno multifatorial associado com a diminuição das funções fisiológicas e celulares, ao aumento na incidência de numerosas doenças degenerativas e à diminuição da capacidade para responder ao estresse oxidativo.

A curiosidade despertada por este acontecimento tem sido de tal forma explorada que, em 2000, Medvedev recenseou mais de 300 teorias sobre o envelhecimento desde o século XVIII (Mota *et al.*, 2004).

Muitos estudos já foram feitos na tentativa de esclarecer os mecanismos

bioquímicos e moleculares acerca do envelhecimento (Sohal *et al.*, 1995). O consenso parece ser que o processo de envelhecimento é multifatorial e as espécies reativas de oxigênio são um fator contribuidor (Fukagawa *et al.*, 1999).

Na década de 1950, Harman propôs a teoria dos radicais livres, postulando que os danos a macromoléculas celulares através da produção de radicais livres em organismos aeróbios é o principal determinante do tempo de vida (Kregel, 2007). Harman define envelhecimento como a progressiva acumulação de diversas alterações deletérias em células e tecidos com o avanço da idade, que aumentam o risco de doença e morte (Harman, 2001).

Outra teoria é a teoria inflamatória do envelhecimento, em que a ativação de fatores de transcrição redox-sensíveis por estresse oxidativo relacionado à idade faz um *upregulation* da expressão de genes pró-inflamatórios (Kregel & Zhang, 2007).

Como dito anteriormente, a primeira teoria de envelhecimento, proposta por Harman (1956) relata que há um declínio bioquímico e fisiológico relacionado a idade associado a um estado crônico de desequilíbrio entre produção de oxidantes e capacidade antioxidante intracelular (Massudi *et al.*, 2012).

Há dois tipos de senescência celular, a replicativa e a induzida por estresse oxidativo. A primeira ocorre naturalmente, com o tempo, e está associada com encurtamento de telômeros e danos ao DNA das células. Em contrapartida, a senescência induzida por estresse oxidativo é causada por fatores externos que incluem agentes oxidantes e radiação o que acaba ativando a cascata de senescência celular de forma prematura (Wang & Bennett, 2012). Estes processos contribuem para o envelhecimento do organismo.

O processo de envelhecimento é alterado ou acelerado quando as DCV estão presentes, além disso, com o envelhecimento, há maior predisposição para o desenvolvimento de doenças (Veronica & Esther, 2012). A doença aterosclerótica é a principal representante dos processos patológicos cardiovasculares ligados ao envelhecimento, uma vez que se manifesta em

indivíduos adultos, sendo que sua incidência aumenta exponencialmente a partir dos 45 anos de idade (Hazzard, 1989). Logo, a aterosclerose é, por excelência, uma doença relacionada ao envelhecimento e a senescência celular (Wang & Bennett, 2012). Vários estudos epidemiológicos têm mostrado que o envelhecimento é um fator de risco importante para as doenças cardiovasculares ateroscleróticas (Lakatta & Levy, 2003). A incidência e prevalência de doenças aterotrombóticas, incluindo doença arterial coronariana e acidente vascular cerebral, aumentam à medida que os indivíduos envelhecem (Minamino & Komuro, 2007).

A lesão vascular relacionada a idade avançada é geralmente considerada resultado de um aumento de estresse oxidativo, levando à inflamação e disfunção endotelial. Os tecidos de animais idosos mostram um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), que levam à alteração da função mitocondrial, danos vasculares com remodelamento associado a idade e oxidação de lipídios o que os torna mais aterogênicos (Collins, 2009).

O envelhecimento e outros fatores de risco para aterosclerose parecem fazer um *upregulation* de vias que aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio, entretanto, por outro lado, diminuem os mecanismos antioxidantes (Collins, 2009).

Além de provocarem o encurtamento telomérico, os radicais livres danificam o DNA, sendo que o envelhecimento caracteriza-se por aumento do acúmulo de danos genéticos e redução dos reparos genômicos (Gava, 2005). O envelhecimento induz maior estresse oxidativo através da produção aumentada de espécies reativas de oxigênio, conseqüentemente, aumentando a oxidação de proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos (Viña *et al.*, 2006; Stadtman, 2006; Peppas, 2008; Spiteller, 2010).

Diversos estudos demonstraram que o envelhecimento celular está associado à redução da integridade funcional das mitocôndrias e, conseqüentemente, ao aumento da produção de radicais livres e espécies reativas (Silva & Ferrari, 2011). Alguns autores da teoria mitocondrial do envelhecimento sugerem que mutações ocorridas no genoma mitocondrial alteram o metabolismo

mitocondrial, reduzindo a produção de ATP e predispondo a célula ao envelhecimento e a diversas doenças associadas a este (Viña *et al.*, 2006; Judge, 2007). Por outro lado, a longevidade estaria associada à manutenção da estrutura e função adequadas das mitocôndrias (Jansen & Osiewacz, 2002; Ferrari, 2004).

Logo, diante deste processo, o que ocorre é que a célula atinge seu limite de reparo não conseguindo mais eliminar ou consertar as macromoléculas danificadas, e o resultado disso é a senescência celular. A consequência desse fenômeno, caso o organismo não consiga realizar o balanceamento necessário é a morte celular ou apoptose.

1.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Na última década, inúmeras evidências indicaram um denominador comum no desenvolvimento da maioria das doenças cardiovasculares, as espécies reativas de oxigênio (Papaharalambus & Griendling, 2007; Monteiro, 2011).

A hipótese da modificação oxidativa, inicialmente proposta por Steinberg e colaboradores, postulava que a oxidação das LDL é obrigatória para o processo da aterogênese (Steinberg *et al.*, 1989). De acordo com essa teoria, o papel das espécies reativas de oxigênio produzidas na parede arterial limitar-se-ia apenas à oxidação das LDL. No entanto, nos últimos anos surgiram várias evidências, de que as espécies reativas têm um papel mais abrangente no desenvolvimento da doença, estando o estresse oxidativo associado à aterogênese, não se limitando as LDL oxidadas, mas também relacionado diretamente com a disfunção endotelial, monócitos e macrófagos, com a apoptose e a proliferação das células musculares lisas (Brito, 2007).

O oxigênio desempenha papel fundamental na formação de radicais livres, dando origem as espécies reativas de oxigênio (Nevitt & Rodrigues, 2007). A noção de estresse oxidativo em sistemas biológicos traz a tona um período no qual as pesquisas sobre oxigênio tinham como foco sua toxicidade e principalmente radiação-X (Gerschman *et al.*, 1954). Nos anos seguintes, o

estresse oxidativo recebeu denominações como “*estresse oxidante*”, “*estresse pró-oxidante*” e “*estresse redutivo*” todos relatados por Sies (1985; 1991; 2000).

O estresse oxidativo foi definido por Sies como sendo “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes, que potencialmente pode induzir uma lesão” (Sies, 1985; 1991; 2000) (Figura 7). Os oxidantes são espécies com elevado potencial de oxidação-redução, enquanto que os antioxidantes são espécies com um potencial de oxidação-redução baixo (Cadenas, 1997).

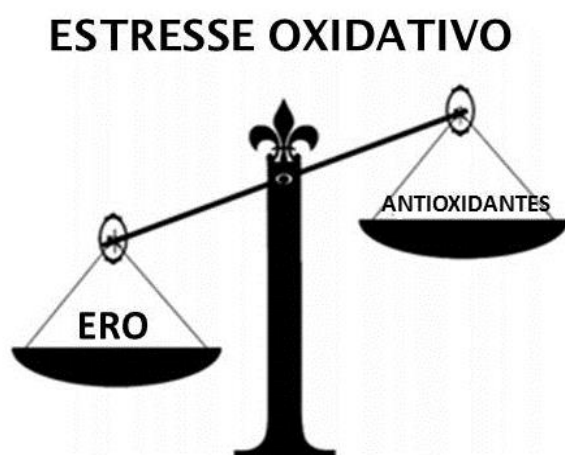


Figura 7: Estresse Oxidativo é o resultado do desbalanceamento entre produção de espécies reativas de oxigênio e sistema antioxidante. Modificada de Kunitomo, 2007.

Espécies reativas de oxigênio são espécies transientes que incluem radicais livres como ânion superóxido (O_2^- , formado pela redução do oxigênio por um elétron), e outros intermediários reativos derivados de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , formado pela dismutação do O_2^- , catalisada pela enzima superóxido dismutase) (Wosniak, 2008).

As células vivas presentes em uma atmosfera rica em oxigênio estão constantemente expostas aos possíveis danos causados pelas espécies reativas de oxigênio, que podem ser geradas endogenamente e/ou exogenamente (Figura 8).

As fontes exógenas de espécies reativas de oxigênio incluem as radiações ultravioleta, ionizantes, herbicidas, poluentes, agentes químicos (Halliwell & Cross, 1994; Gille & Sigler, 1995) e metais pesados (Liang & Zhou, 2007; Xu *et al.*, 2011). Já as ERO endógenas são formadas pelo próprio metabolismo celular através da mitocôndria, peroxissomos, lipoxigenases (Boveris *et al.*, 1972; Turrens & Boveris, 1980; Turrens, 1997; Halliwell & Gutteridge, 2007) ou principalmente através do complexo NADPH oxidase presente nas células endoteliais, macrófagos, músculo liso e células tronco hematopoiéticas e mesenquimais da medula óssea. Processos patológicos também produzem espécies reativas de oxigênio, como no caso das respostas inflamatórias. (Berra *et al.*, 2006; Farrugia, 2012).

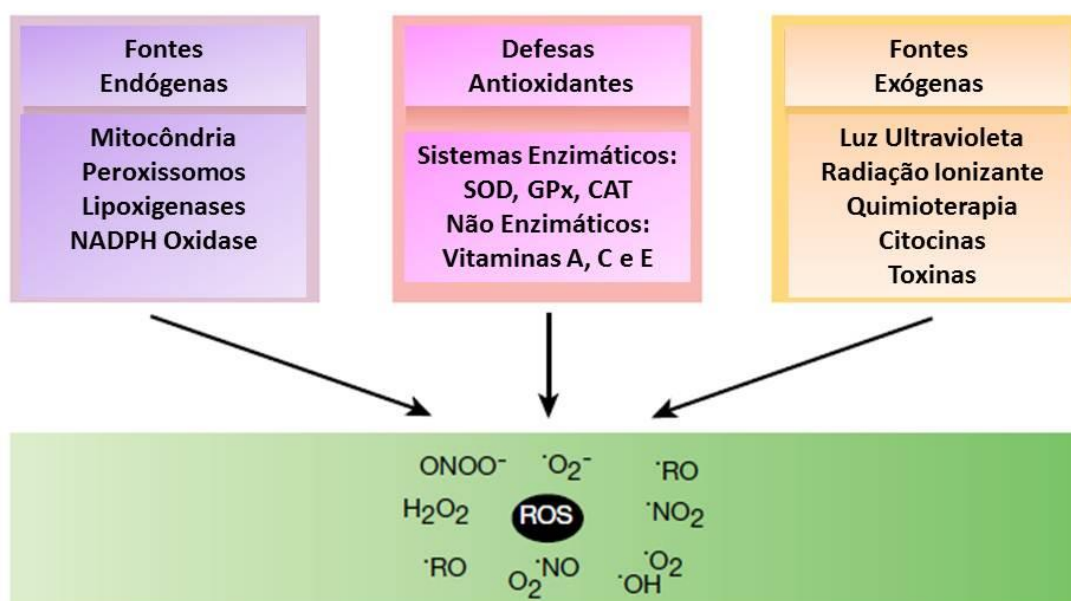


Figura 8: Fontes exógenas e endógenas de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Modificada de Finkel e Holbrook (2000). SOD – Superóxido Dismutase; GPx – Glutathiona Peroxidase; CAT – Catalase.

As espécies reativas de oxigênio, no entanto, podem ser consideradas moléculas com funções de segundo mensageiros. Entre as funções fisiológicas das ERO estão a regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox

e as alterações da homeostase celular através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas. Por conseguinte, o meio biológico utiliza as espécies reativas de oxigênio, quando em quantidade regular, como vias de sinalização celular (Finkel & Holbrook, 2000; Ribeiro *et al.*, 2005; Clempus & Griedling *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo relacionado ao envelhecimento varia de indivíduo a indivíduo, pois depende, além dos fatores genotípicos, do balanço na ingestão alimentar de antioxidantes (vitaminas, minerais, compostos fenólicos e outros) e pró-oxidantes (excesso de gorduras, etanol e carboidratos), da quantidade de ingestão calórica e do nível de atividade física (sedentarismo x fisicamente ativo) (Silva & Ferrari, 2011).

O estresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos, devido a menor formação ou maior consumo, ou do aumento da geração de espécies oxidantes. Tudo isso gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares (Oga, 2003).

As espécies reativas de oxigênio como ânions superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio são constantemente produzidos como produtos da respiração celular. Em quantidades baixas são essenciais para algumas funções celulares, como por exemplo, na função imune e vasodilatação. Entretanto, em concentrações elevadas são capazes de causar danos às proteínas, lipídeos e DNA (Sohal, 1995; Halliwell, 1999; Massudi *et al.*, 2012). O dano oxidativo ao DNA é o maior fator relacionado a doenças e ao envelhecimento (Chance *et al.*, 1979; Massudi *et al.*, 2012).

Recentemente, foi demonstrado que enzimas envolvidas na produção e remoção das ERO são expressas em diversos tecidos, inclusive em células vasculares. A produção intencional de ERO parece ser importante para promover uma função vascular normal, atuando como moléculas de sinalização celular, desde a proliferação de células musculares lisas até o controle de seu tônus (Clempus & Griendling, 2006).

Normalmente, a quantidade e a magnitude de formação de espécies oxidantes são balanceadas pela sua taxa de metabolização ou eliminação. Entretanto, quando as células chegam a um limite da capacidade antioxidante, pode haver um desequilíbrio entre pró e antioxidantes, ocorrendo o fenômeno de estresse oxidativo, induzindo, conseqüentemente, a um dano celular (Sies, 1991; Touyz, 2004).

O estresse oxidativo é um importante fator para a iniciação e progressão de muitas doenças vasculares incluindo hipertensão, aterosclerose e acidentes vasculares, conforme podemos observar na Figura 9 (Cai & Harrison, 2000; Madamanchi *et al.*, 2005).

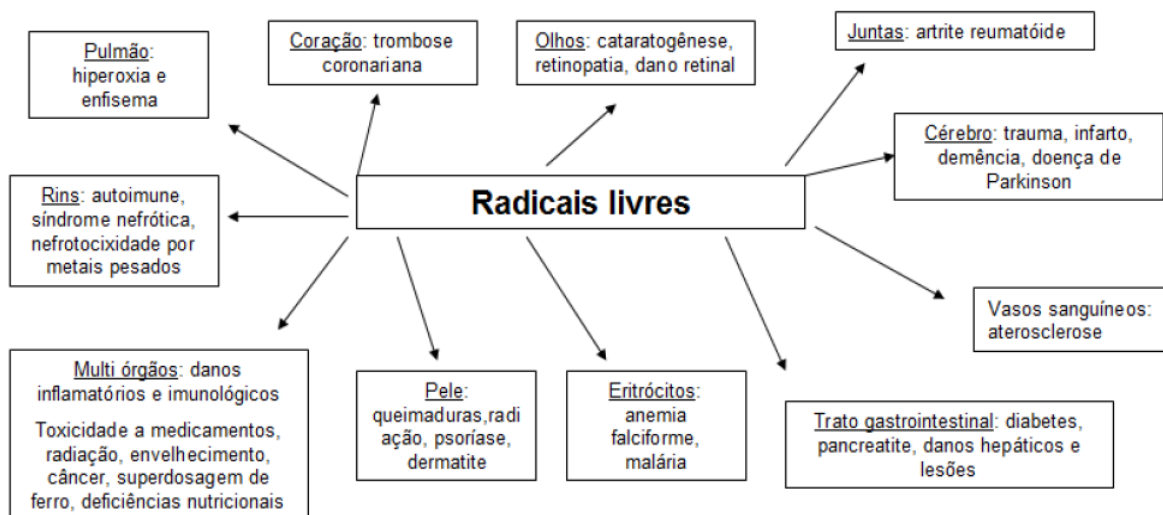


Figura 9: Participação dos radicais livres em diversas doenças. Modificada de Granato (2011).

Portanto, o estresse oxidativo tem sido relacionado a diversas condições patológicas: aterosclerose (Esterbauer, 1992; Keany & Vita, 1995; Witzum & Steinberg, 2001; Singh *et al.*, 2006), doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer (Giasson *et al.*, 2002; Butterfield, 2004), Esclerose Amiotrófica Lateral (Sorg, 2004), mal de Parkinson (Cui *et al.*, 2004) e câncer (Loo, 2003; Ribeiro, 2005), hipertensão, hipertrofia cardíaca, trombose, restenose (Lassegue *et al.*, 2010) e diabetes (Rojas *et al.*, 2006).

Em mamíferos, são fontes de produção de ERO: as enzimas NADPH oxidases,

a cadeia transportadora mitocondrial de elétrons, a família das enzimas óxido nítrico sintases, as enzimas metabolizadoras do ácido araquidônico (ciclooxigenases, lipoxigenases e citocromo P450) e a xantina oxidase (Miller *et al.*, 2007). Entretanto, há evidências de que a NADPH oxidase é a principal fonte de produção de ERO no sistema cardiovascular (Griendling *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 2005; Cave *et al.*, 2006).

O complexo enzimático NADPH oxidase (Figura 10) é um dos maiores produtores de radicais livres no organismo e está presente nas membranas celulares de macrófagos, células endoteliais, neutrófilos, fibroblastos e outras células. Sabe-se que há um aumento da produção de radicais livres nas doenças cardiovasculares. Logo, ocorre aumento da atividade da enzima NADPH oxidase, na qual os radicais são liberados na circulação sanguínea e interagem com lipídios, proteínas e principalmente moléculas de DNA (Ryter & Tyrrel, 1998; Dworakowski, 2006).

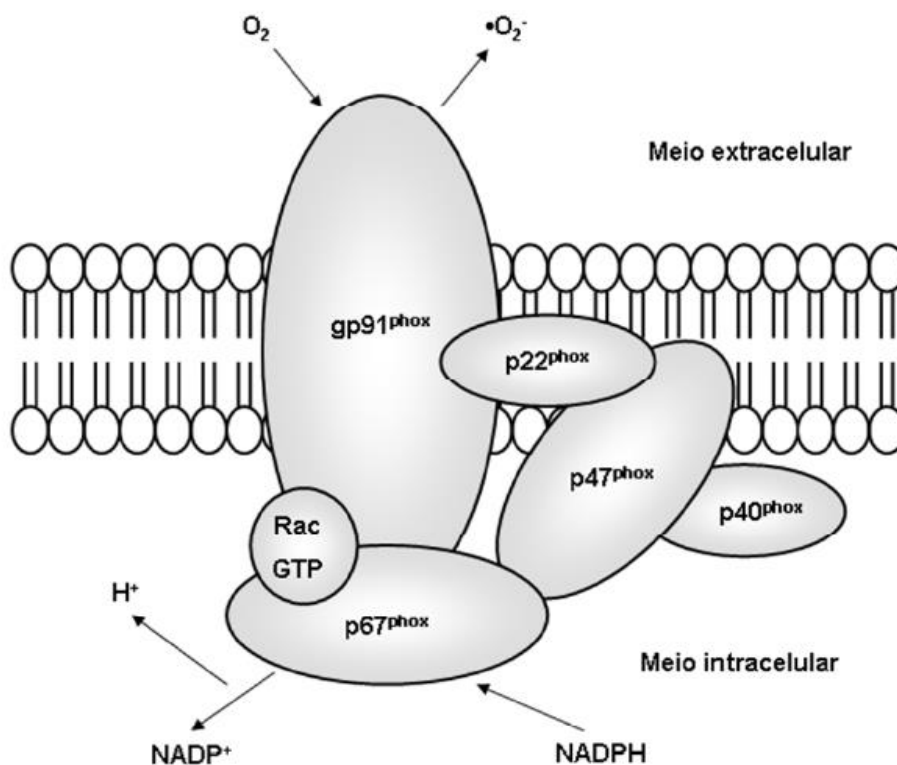


Figura 10: Estrutura da NADPH oxidase. Modificada de Rabelo *et al.*, 2010 e Dusting *et al.*, 2005.

As NADPH oxidases são proteínas transmembrana que têm, por excelência, a função de transferir os elétrons através das membranas celulares. Geralmente,

o acceptor de elétrons é o oxigênio e, dessa forma, em decorrência desse processo, gera-se o radical O_2^- . (Bernard & Krause, 2007; Barbosa *et al.*, 2010). Estas enzimas possuem diversas subunidades que variam conforme o tecido, com destaque para gp91phox que resultou na formação da família Nox (*Nonphagocytic NADPH Oxidase*), constituída atualmente por sete membros (Nox1, Nox2 - formalmente conhecida como gp91phox-, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2 [Dual oxidase]) (Paravacini & Touyz, 2008; Chen *et al.*, 2008; Schappi *et al.*, 2008; Rabelo *et al.*, 2010).

Os principais componentes do complexo enzimático NADPH oxidase, Nox1 e Nox4, são altamente expressos nas células vasculares e aumentados durante o processo de remodelamento vascular, como na hipertensão e aterosclerose (Lassegue & Clempus, 2003).

As espécies reativas normalmente interagem com compostos de baixo peso molecular como enzimas antioxidantes ou co-fatores enzimáticos, lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos e carboidratos. Como consequência, um novo radical é gerado, podendo ser ativada na verdade uma reação em cadeia, induzindo danos celulares. As ERO são formadas através do mecanismo de oxi-redução do oxigênio, cujo grupo pode ser subdividido em *radicais livres*, estruturas com elétrons desemparelhados altamente reativos e instáveis, como ânion superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-) e óxido nítrico (NO), e em *não radicais* como o H_2O_2 e o $ONOO^-$ os quais possuem uma estabilidade maior, portanto menos reativos, apresentando uma meia-vida mais prolongada. Dentre as espécies reativas apresentadas, o NO, O_2^- e o H_2O_2 são os principais produtos de células do sistema cardiovascular (Miller *et al.*, 2007; Paravacini & Touyz, 2008).

Apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) tem meia-vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao ferro (Ferreira & Matsubara, 2007). Exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar o radical hidroxila. O H_2O_2 é gerado *in vivo* pela dismutação do ânion-radical superóxido (O_2^-) por enzimas oxidases

ou pela β -oxidação de ácidos graxos. As mitocôndrias são importantes fontes de O_2^- e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em enzima superóxido dismutase (SOD) que o converte em H_2O_2 . O peróxido de hidrogênio gerado é então eliminado por catalases, glutathione peroxidase e peroxidases (Barreiros & David, 2005).

O aumento das ERO devido ao desequilíbrio redox foi constatado nas artérias aorta, carótida, mesentérica e coronárias de ratos e camundongos idosos, sugerindo que este desequilíbrio está associado ao envelhecimento, com o aumento da atividade da NADPH oxidase (Parcher *et al.*, 2007).

O ânion superóxido (O_2^-), constitui a espécie reativa de oxigênio primária, pois é formado em sistemas biológicos pela primeira redução do oxigênio molecular, numa reação catalisada pela enzima NADPH oxidase. Essa reação ocorre geralmente nas membranas mitocondriais. É formado principalmente como um intermediário nas reações bioquímicas. Uma vez gerado, o O_2^- pode agir com um radical livre fraco, como elétron redutor ou elétron oxidante. Possui uma longa meia-vida que permite sua difusão para o interior da célula (Genestra, 2007).

Em humanos, a expressão elevada de subunidades proteicas de NADPH oxidase está associada ao aumento da produção de íons superóxido (O_2^-), e a severidade da aterosclerose (Sorescu *et al.*, 2002).

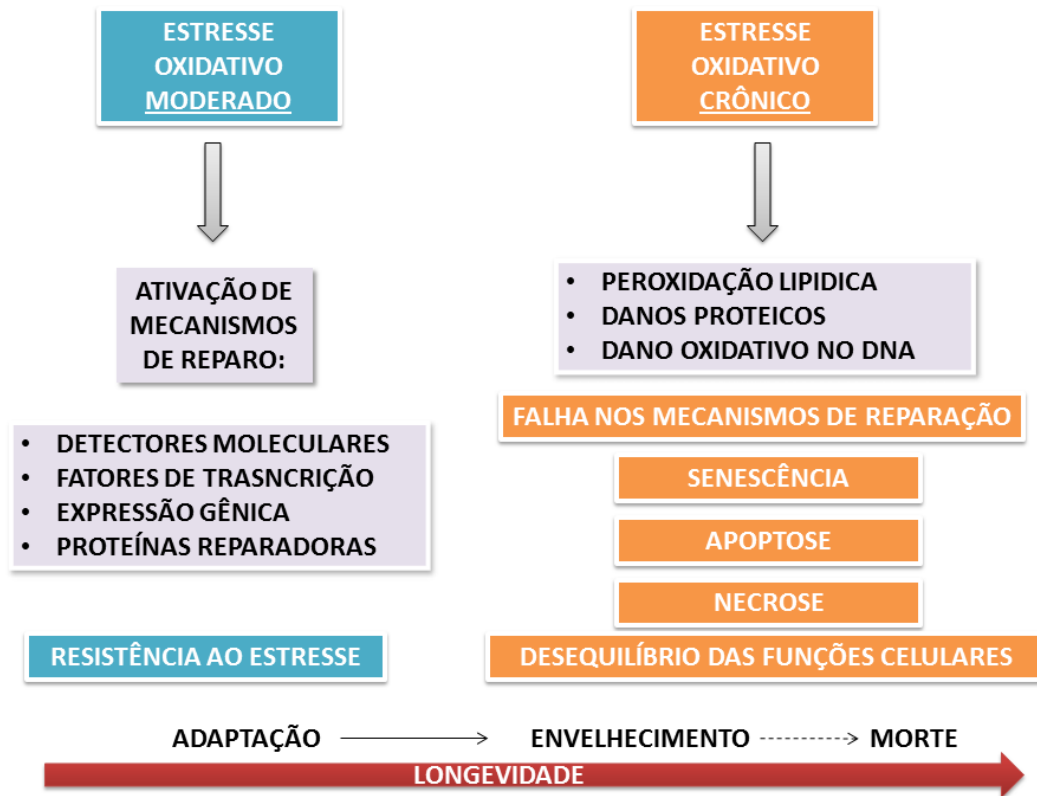
Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas de oxigênio, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (Filho *et al.*, 1983; Ferreira, 1997).

O processo de peroxidação lipídica se inicia quando espécies reativas abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácido graxo poli-insaturados das membranas ou de partículas das lipoproteínas, formando o radical lipídico. Este por sua vez sofre rearranjo molecular formando um dieno conjugado que reage com o oxigênio produzindo radical peroxil, o qual na presença de um outro lipídeo ou outro doador de elétron,

forma hidroperóxido lipídico e um outro radical lipídico (Stocker & Keaney, 2004).

O estresse oxidativo provoca, portanto a peroxidação lipídica, e além disso, danos oxidativos no DNA e proteínas (Gutteridge & Halliwell, 2010). Acredita-se que as ERO sejam causadoras de mais de 20 tipos diferentes de dano ao DNA (Slupphaug *et al.*, 2003), como modificações químicas nas bases nitrogenadas, formação de sítios abásicos, cross-links DNA-proteína e quebras de fita simples ou dupla (Loft & Poulsen, 1996; Ashok *et al.*, 1997) e expulsão de micronúcleos de DNA (Wang & Bennett, 2012). Estes danos provocam alterações severas no DNA, ocasionando mudanças na expressão gênica e favorecendo o desenvolvimento de doenças crônicas (Lee *et al.*, 2004).

Como já fora citado, as células estão constantemente expostas a espécies reativas de oxigênio, seja por fatores endógenos ou por fatores ambientais, logo quando as células sofrem exposição ao estresse oxidativo moderado, a maioria dos seus efeitos fisiológicos, estimula mecanismos de reparo e defesas celulares. Por conseguinte, a expressão dos genes que codificam as enzimas antioxidantes e sistemas de reparo de DNA é aumentada a fim de manter um nível fisiológico do estresse oxidativo, que prepara as células contra um estresse subsequente. No entanto, a acumulação de estresse leva à ineficiência destes mecanismos de proteção de danos levando, conseqüentemente ao envelhecimento, à senescência, e finalmente à morte celular. Logo, há dois tipos de estresse oxidativo, o moderado, que ocorre regularmente e é regulado pelo organismo através do sistema antioxidante e mecanismos de reparo, e, o crônico, no qual ocorre excesso de danos ao DNA, às proteínas e lipídios. Neste, os mecanismos de reparo são insuficientes acarretando em senescência e apoptose (Linton *et al.*, 2001; Trescases *et al.*, 2010) (Figura 11).



(Modificado de Trescases, 2010)

Figura 11: Efeitos do estresse oxidativo moderado (azul) e crônico (laranja).

Neste contexto, é necessário ressaltar o papel dos antioxidantes para o organismo, visto que são substâncias que protegem contra o dano oxidativo, mesmo quando presentes em pequena quantidade (Halliwell & Gutteridge, 1999). Vale destacar alguma delas: Superóxido Dismutase (SOD) que atua convertendo o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, Glutathione Peroxidase (GPX) que, por sua vez, converte peróxido de hidrogênio em água, assim como a enzima Catalase (CAT), cada uma destas tem papel de destaque durante a produção de espécies reativas na aterosclerose (Loon *et al.*, 2012).

Portanto, em situações fisiopatológicas, como na aterosclerose, ocorre aumento exacerbado da produção de espécies reativas de oxigênio, devido a um desequilíbrio muito grande entre fatores oxidantes e antioxidantes, resultando, entre outros processos, em apoptose celular.

1.5 APOPTOSE

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem de uma interação entre as células que o constituem. No desenvolvimento embrionário, muitas células produzidas em excesso são levadas à morte, contribuindo para a formação dos órgãos e tecidos (Meier *et al.*, 2000; Grivicich *et al.*, 2007).

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Como consequência, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta o seu volume e perde as suas funções metabólicas. Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (Yu *et al.*, 2000; Hengartner *et al.*, 2000; Grivicich *et al.*, 2007).

De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido, no qual ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e rompem, originando estruturas que contém o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos. Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório. Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico (Saraste *et al.*, 2000; Grivicich *et al.*, 2007).

Curiosamente, o termo apoptose tem origem grega e significa “queda das flores no outono”. A apoptose é um mecanismo de morte celular, essencial para o

desenvolvimento e manutenção dos organismos multicelulares, pelo qual são eliminadas células danificadas, envelhecidas e indesejáveis, Este termo foi introduzido em 1972 por Kerr e colaboradores, para definir um tipo de morte, que morfológicamente se caracteriza por uma diminuição do tamanho da célula, uma condensação da cromatina e formação de invaginações de membranas das quais resultam vesículas, que são liberadas da superfície celular, designadas de corpos apoptóticos, que são subsequentemente fagocitados limitando a ocorrência de um processo inflamatório. que se distingue morfológica e bioquimicamente da necrose, outra forma bastante comum de morte celular. A necrose é considerada um evento caótico e rápido, sempre patológico e sem regulação. Na necrose, ocorre ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular para o meio extracelular, desencadeando processos inflamatórios (Kerr *et al.*, 1972). Essas diferenças podem ser observadas na Figura 12 (Cruchten & Broeck, 2002; Favero, 2003).

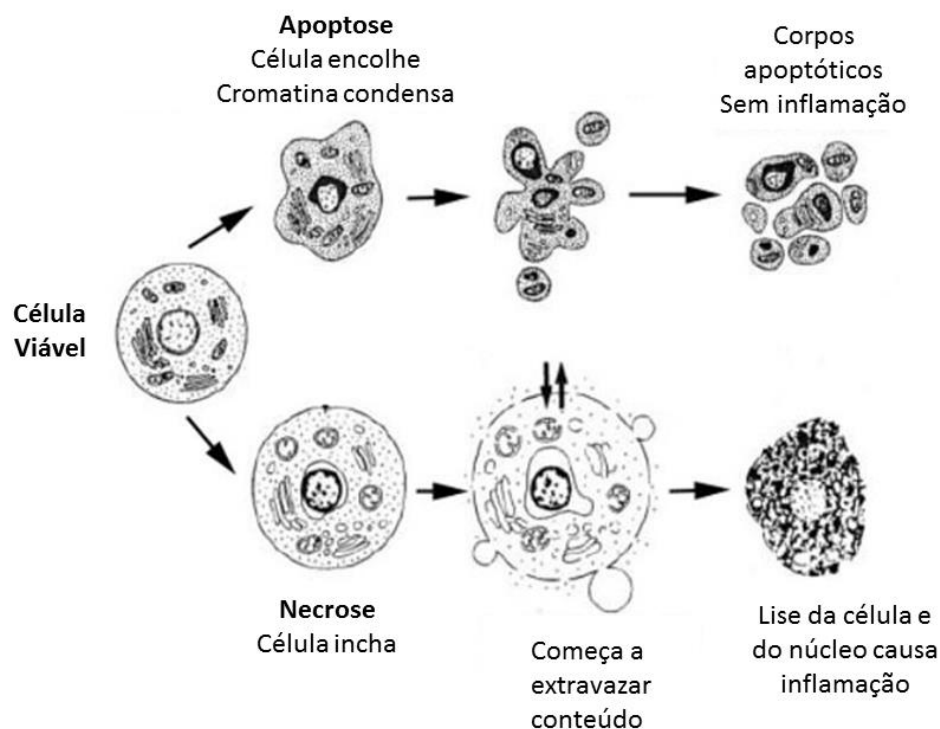


Figura 12: Apoptose e Necrose – diferenças. Modificada de : <http://www.celldeath.de/mainfram.htm>

Outro processo de morte celular, que é importante ser diferenciado é a autofagia. A autofagia é um processo catabólico que envolve a degradação dos próprios componentes celulares através da maquinaria lisossomal (Yang & Klionski, 2010). É um tipo de resposta importante ao estresse e está relacionada a alguns tipos de doenças (Levine & Kroemer, 2008; Kroemer *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013). O processo de autofagia é estimulado quando há: escassez de nutrientes, estresse metabólico, estresse do retículo endoplasmático e durante tratamentos contra o câncer (Qiang *et al.*, 2012).

A apoptose desempenha um importante papel no desenvolvimento e na homeostasia tecidual, pois durante o desenvolvimento, muitas células são produzidas em excesso e eventualmente ocorre morte celular programada contribuindo para manutenção do organismo. No contexto fisiológico, a apoptose é regulada e balanceada. Quando ocorrem falhas neste equilíbrio, condições patológicas tais como defeitos de desenvolvimento, doenças autoimunes, neurodegeneração ou câncer são observadas. Além de seu papel na homeostasia, a morte celular programada também pode ser desencadeada por vários determinantes, tais como radiação gama ou ultravioleta, privação de fatores de crescimento, quimioterápicos ou sinalização por receptores de morte (Ashkenazi & Dixit, 1998; Jin & El-Deiry, 2005).

Várias organelas, como as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e os lisossomos, além de várias famílias de proteínas, como proteases, caspases, calpaínas e catepsinas participam do processo de apoptose (Leist & Jaattela, 2001), que podem ser desencadeados fora (via extrínseca) ou dentro da célula (via intrínseca) (Harada-shiba, 1998).

Conforme citado anteriormente, os processos desencadeadores da apoptose podem ser iniciados fora (via extrínseca) ou dentro da célula (via intrínseca) (Harada-shiba, 1998). Na via extrínseca são comumente ativados os chamados receptores de morte, ativadores de caspases que através de proteólise são responsáveis pela maior parte das modificações que ocorrem na apoptose. A via intrínseca é iniciada dentro da célula e pode ser induzida por ativação do p53, esteroides e danos oxidativos, como ocorre, por exemplo, na aterosclerose pela oxidação lipídica (Martin, 2003; Favero, 2003).

A morte celular na aterosclerose foi sugerida por Virchow em 1858. O pai da patologia celular declarou que a placa aterosclerótica é formada por células que replicam e morrem. Ele chamou esta fase de degeneração fibro-gordurosa (*fibro-fatty degeneration*) (Virchow, 1858). Atualmente, diversos estudos tem relacionado aterosclerose e apoptose (Isner *et al.*, 1995; Geng e Libby 1995; Han *et al.*, 1995; Hegyi *et al.*, 1996; Kockx *et al.*, 1996; Bjorkerud *et al.*, 1996; Newby & George, 1996; Kockx *et al.*, 1998; Bennett *et al.*, 1999; Deshpande *et al.*, 2007).

Enquanto níveis baixos de ERO são necessários para a função vascular normal, a produção em excesso ou a não remoção deste excesso, em um ambiente pró-inflamatório, como na aterosclerose, acaba levando a apoptose de alguns tipos celulares, como das células musculares lisas (Papaharalambus & Griendling, 2007).

As células musculares lisas, endoteliais, macrófagos e células da circulação de pacientes idosos com aterosclerose apresentam, além de encurtamento dos telômeros, aumento da fragmentação de DNA, quando comparados com pacientes mais jovens. Eventualmente o aumento da fragmentação de DNA leva a senescência e apoptose celular (Botto *et al.*, 2001; Martinet *et al.*, 2002; Mahmoudi *et al.*, 2008).

Portanto, tendo em vista que tanto a aterosclerose, durante o desenvolvimento da placa, quanto o envelhecimento estão envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio, nosso estudo visa demonstrar e avaliar os impactos oxidativos causados em células de sangue, aorta e medula óssea de camundongos ateroscleróticos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os impactos oxidativos causados pela aterosclerose e envelhecimento em células de aorta, sangue e medula óssea de camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o nível de glicose no sangue;
- Constatar e quantificar a formação da placa aterosclerótica;
- Analisar a produção de ânions superóxido em cortes histológicos de aorta;
- Verificar a produção de ânions superóxido nas células isoladas de medula óssea, sangue e aorta através de citometria de fluxo;
- Verificar a produção de peróxido de hidrogênio nas células isoladas de medula óssea, sangue e aorta através de citometria de fluxo;
- Quantificar o percentual de apoptose nas células isoladas de medula óssea, sangue e aorta através do teste de Anexina-FITC-PI pela citometria de fluxo;
- Analisar a fragmentação de DNA, através do ensaio do cometa, em células isoladas de medula óssea.

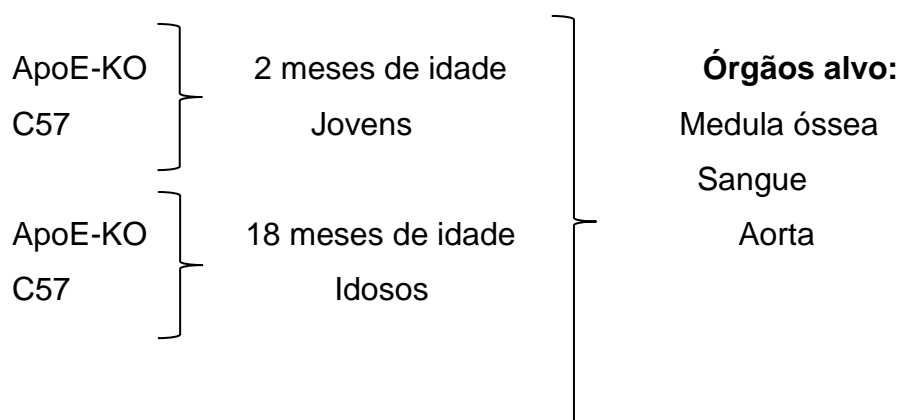
3 METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) controle (C57BL/6) e ateroscleróticos (ApoE-KO) machos, provenientes do biotério do Laboratório de Transgenes e Controle Cardiovascular, pertencente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), isogênicos, logo filhos de casais irmãos, com baixa variabilidade genética.

Os animais foram mantidos em gaiolas onde receberam água e ração *ad libitum*. Foram submetidos a ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (70%) do ambiente. A utilização dos animais foi realizada de acordo com normas estabelecidas pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Animais - Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) e a *American Physiological Society* (APS). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (CEUA-EMESCAM #010/2009).



Foram utilizados aproximadamente 88 animais, sendo 6 animais para cada grupo ApoE-KO e C57 jovens e idosos. Um mesmo grupo de animais foi selecionado para citometria de fluxo nos testes de Anexina V-PI, DHE e DCF-DA (n=24, sendo n=6 para cada grupo jovem e idoso de C57 e ApoE-KO). Outro grupo de animais foi submetido ao ensaio do cometa nas células mononucleares de medula óssea (n=24) e outro grupo foi selecionado para análise da placa aterosclerótica e colesterol total (n=16) e DHE em cortes histológicos de aorta (n=24).

3.2 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE COLESTEROL PLASMÁTICO

A análise de lipídeos plasmáticos foi realizada por meio de kit enzimático comercial (Bioclin, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/kg) e, em seguida, o sangue foi coletado via punção intracardíaca. O sangue foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm para separação do soro. O colesterol total foi determinado após hidrólise enzimática e oxidação das amostras de soro. O indicador quinoneimina é formado a partir do peróxido de hidrogênio e 4-aminofenazona na presença do fenol e peroxidase, obtendo-se assim uma coloração rosa em intensidade proporcional à quantidade de colesterol da amostra. A leitura das amostras foi realizada no espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a 500nm.

3.3 ANÁLISE DO NÍVEL DE GLICEMIA

Com a finalidade de excluir outro parâmetro metabólico que poderia ser afetado pelo envelhecimento e principalmente pela aterosclerose, foi determinado o nível de glicose sanguínea através de glicômetro digital (Prestige IQ, Home Diagnostics, Florida, EUA). Para isso, uma amostra de sangue da cauda dos animais foi coletada e colocada em tiras reagentes para leitura no glicômetro. Para eliminar possíveis erros de leitura, utilizamos como controle corretivo tiras padrão fornecidas pelo próprio fabricante (as variações de leitura foram desta

forma corrigidas).

3.4 HISTOLOGIA DE ARTÉRIA AORTA

Foram realizados cortes histológicos de artéria aorta torácica. Para isso, os camundongos foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/kg), logo após foi feita uma incisão torácica que permitiu a exposição do coração. Em seguida, foi realizada uma pequena incisão no átrio direito e rapidamente infundida solução salina tamponada (PBS – pH 7,4) acrescida de paraformaldeído 4% (0,1M, pH 7,4) no ventrículo esquerdo a uma pressão constante de 100 mmHg. Para montagem histológica, o excesso de tecido conjuntivo foi retirado e a aorta emblocada em OCT gel congelante (*Optimum cutting temperature*) e posteriormente colocado no freezer. Para efetuar os cortes histológicos os órgãos foram posicionados de forma que se obtivesse cortes de 8µm de espessura em micrótomo criostato (Leica). Os cortes foram colocados em uma lâmina previamente gelatinizada. Posteriormente, os cortes foram corados com Oil red O e DHE e submetidos à captura de imagem com câmera fotográfica acoplada a um microscópio Nikon (EUA).

3.5 PREPARO DA AORTA EN FACE PARA ANÁLISE DE DEPOSIÇÃO LIPÍDICA

Os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (91/9.1 mg/kg) e posteriormente, perfundidos, através do ventrículo esquerdo, com solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,4; 0,1M). Foi retirada a artéria aorta e o tecido adiposo removido, em seguida, a aorta foi aberta longitudinalmente para coloração em face com Oil red-O (Sigma Aldrich, St. Louis. MO, EUA) para detecção de lipídeos neutros. As aortas ficaram submersas em solução de coloração por 1 minuto e, em seguida, foram lavadas em água por 5 minutos para remoção do excesso de corante. As imagens foram capturadas através de lupa de alta definição acoplada com câmera Canon. A quantificação dos lipídeos foi realizado através do software Image-J (Image-J 1.35 d, NIH,

Bethesda, USA).

3.6 COLETA DE SANGUE

Os animais foram anestesiados com Ketamina Xilasina (91/9.1 mg/kg) e o sangue coletado por punção intracardíaca. Para tanto, os animais foram colocados em decúbito lateral. Em seguida, uma agulha de 26-gauge, acoplada a uma seringa plástica heparinizada de 1 ml, foi inserida pelo espaço intercostal até o coração e o sangue lentamente coletado (Figura 13). Imediatamente após a coleta, o sangue foi acondicionado em microtubos contendo o anticoagulante heparina, sendo 200 µl destinados à realização da citometria de fluxo.

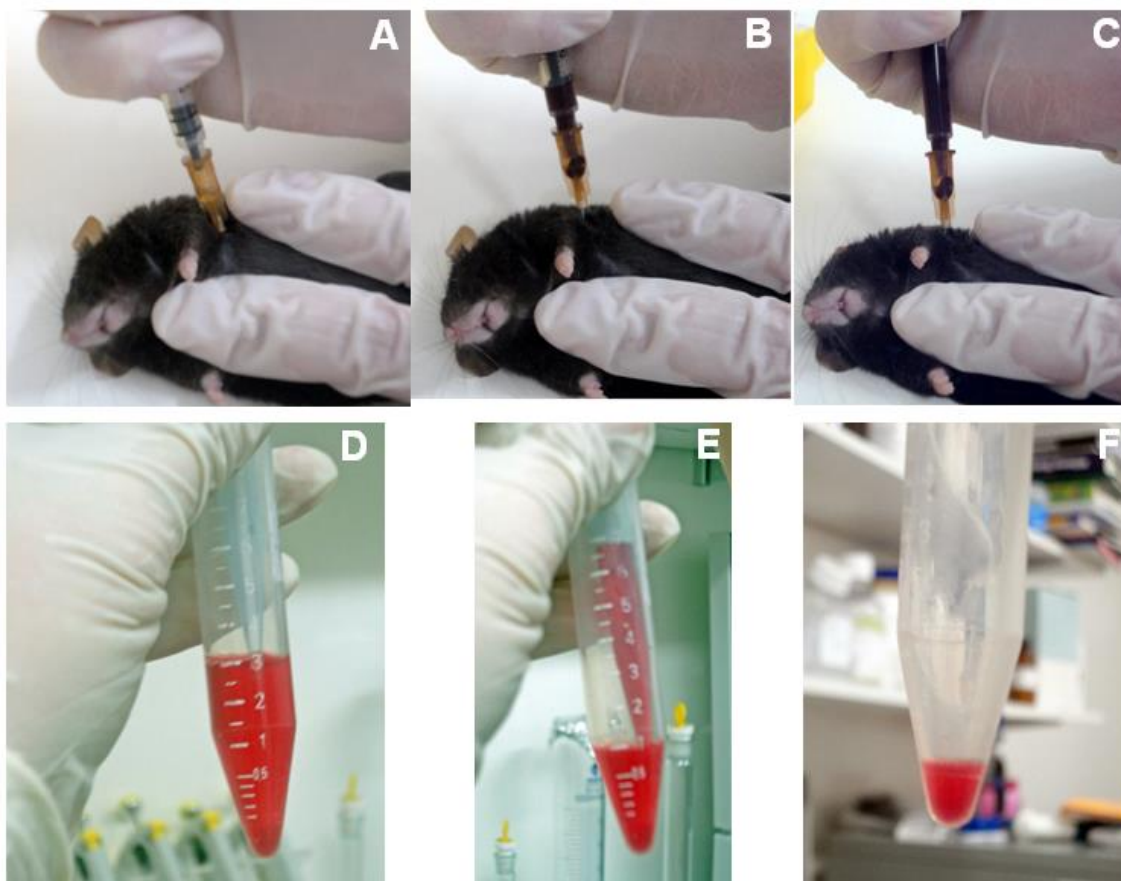


Figura 13: Coleta intra-cardíaca de sangue (A-C) e lise de hemácias (D-F) para análise por citometria de fluxo e lise das hemácias (D-F).

3.6.1 Lise do sangue

Após a coleta do sangue diretamente do coração, foi separada uma amostra de

200ul para análise por citometria de fluxo após a lise de hemácias. Para tal, foram adicionados 2ml de solução de lise pré-aquecida a 37°C (BD Pharm Lyse, # 555899) aos 200ul de sangue (Figura 12 D-F), previamente separados, e imediatamente foram vortexados. A solução de lise (10X) foi diluída (1X) com água destilada e mantida em temperatura ambiente. Em seguida, o tubo foi incubado em estufa a 37°C por 5 minutos. Decorrido este tempo, a reação foi parada acrescentando-se 2ml de PBS ao tubo. Passado este tempo o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 1200rpm (Eppendorf: Centrifuge 5702). Logo após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 2ml de solução de PBS (PBS: *Phosphate Buffered Saline*) com 1% de soro fetal bovino (FBS: *Fetal Bovine Serum*) e novamente centrifugado por 10 minutos a 1200rpm. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em 1ml de PBS com soro fetal bovino. É importante ressaltar que este procedimento de lise foi feito 2 vezes seguidas para o sangue. As células foram mantidas a 4°C até a marcação para análise por citometria de fluxo. Uma alíquota foi separada para contagem em câmara de Neubauer.

3.7 ISOLAMENTO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

Os fêmures e as tíbias dos animais foram removidos, assim como o excesso de músculo e tecido conjuntivo ao redor dos ossos. As epífises foram cortadas para exposição do canal medular. Para remoção da medula óssea, uma agulha de 26-gauge acoplada a uma seringa plástica de 1 ml foi inserida na cavidade medular para retirada da medula óssea através de *flush* utilizando meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Sigma). A suspensão de medula óssea foi homogeneizada e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos (Eppendorf: Centrifuge 5702). O sobrenadante foi desprezado, e as células ressuspensionadas em solução de lise de hemácias (BD Pharm Lyse, # 555899).

Para isso, foram adicionados 2 ml de solução de lise 1X ao tubo contendo o precipitado de células da medula. Em seguida, os tubos foram vortexados e incubados, em temperatura ambiente, por 15 minutos para rompimento de hemácias. As amostras foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. Em seguida, o *pellet*

foi ressuspendido em 2 ml de PBS acrescido de 1% de FBS inativado (PBS-iFBS) para lavar o excesso de solução de lise e as amostras novamente centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos. As amostras de medula óssea, assim como as de sangue, foram incubadas duas vezes com solução para lise de hemácias, portanto os procedimentos descritos acima foram realizados duas vezes. Por fim, o sobrenadante foi aspirado e as células ressuspendidas em 1 ml de PBS-iFBS e mantidas a 4°C até a marcação para análise por citometria de fluxo. Uma alíquota foi separada para contagem em câmara de Neubauer. Este procedimento está demonstrado na figura 14.

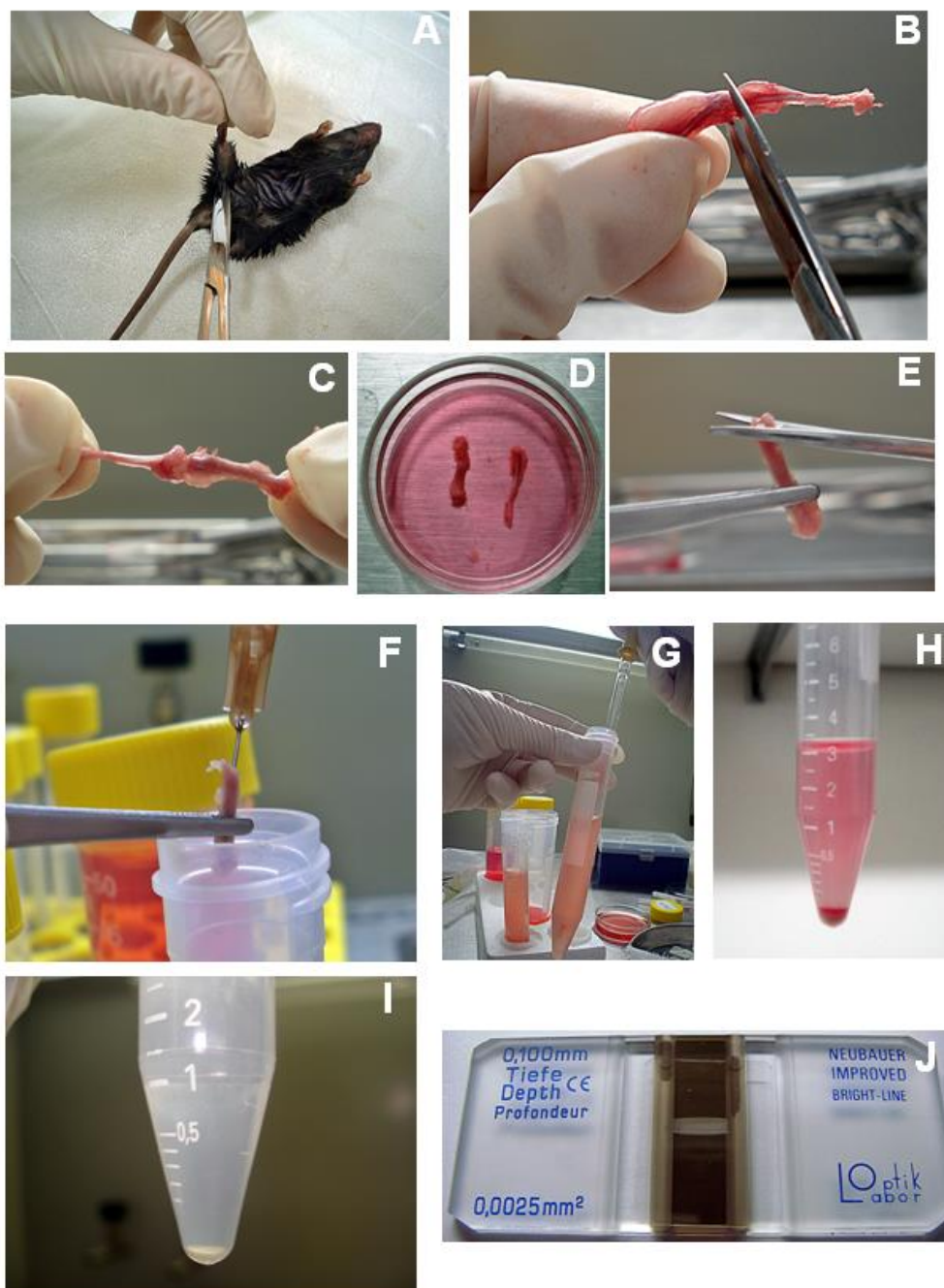


Figura 14: Isolamento de células da medula óssea. A e B) Retirada do fêmur e tíbia. C) Remoção do excesso de tecidos conjuntivos. D) Fêmur e tíbia em meio de cultura DMEM. E) Corte das epífises dos ossos para fazer o flush. F) Flush da medula óssea. G e H) Centrifugação e solução de lise de hemácias. I) Pellet de células da medula óssea. J) Contagem em câmara de Neubauer.

Para o protocolo do Ensaio do Cometa, após a centrifugação da suspensão obtida do flush de medula óssea com o meio de cultura DMEM, o sobrenadante foi descartado e as células, no fundo do tubo, foram homogeneizadas em 4 ml de meio de cultura DMEM. Em um outro tubo *falcon* foram adicionados 4ml de gradiente de densidade Histopaque 1083® (SIGMA ALDRICH), que consiste de uma solução de polisacarose e diatrizoato de sódio com densidade de 1,083 g/ml, específico para células de ratos e camundongos.

A função do gradiente de densidade é separar em diferentes camadas as células mononucleares (células tronco, linfócitos e monócitos), granulócitos, plaquetas e eritrócitos. Os 4ml de células com meio de cultura foram pipetados e colocados delicadamente no outro tubo pela parede sobre o gradiente de densidade Histopaque, com muito cuidado para não misturar as duas fases.

Os tubos contendo 4ml de células com meio de cultura e 4ml de gradiente de densidade Histopaque, totalizando um volume final de 8ml de solução, foram então levados para centrífuga (Eppendorf 5702) com rotor *swing-bucket*, sem freio, por 30 minutos a 1500rpm.

Durante a centrifugação, os eritrócitos e os leucócitos granulócitos atravessam a fase orgânica, que consiste o gradiente de densidade Histopaque, e sedimentam no fundo do tubo. A “nuvem” de células mononucleares encontra-se na interface entre as duas soluções e, as plaquetas e proteínas plasmáticas localizam-se na fase aquosa (fase superior).

Observa-se um anel celular na interface entre as fases orgânica (Histopaque, fase inferior) e aquosa (fase superior), onde estão presentes as células mononucleares. O anel de células mononucleares formado entre o meio de cultura e o gradiente de densidade foi imediata e delicadamente coletado utilizando-se uma pipeta Pasteur de vidro e colocado em um novo tubo *falcon*.

O gradiente de densidade Histopaque é extremamente tóxico para as células, por isso, quando as células mononucleares são coletadas do tubo, é normal que esta contenha também resíduos deste gradiente. Logo, foi necessário centrifugar as células por 10 minutos a 1200 rpm e em seguida adicionar uma solução salina tamponada (*Phosphate Buffer Solution* - PBS 10%) para lavar o excesso de gradiente. A lavagem foi repetida três vezes para garantir a remoção completa de qualquer vestígio de gradiente de densidade. A última etapa consistiu em retirar todo excesso de PBS após a última lavagem e ressuspender as células em 1ml de DMEM.

3.8 ISOLAMENTO DE CÉLULAS AÓRTICAS

Após a perfusão dos animais com PBS pH 7.4 a aorta torácica foi removida cuidadosamente e transferida para uma placa de Petri contendo 2 ml de solução salina balanceada de Hank (HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*) aquecida (37°C), onde procedeu-se a remoção de tecidos gordurosos e foi feita a limpeza superficial para retirada de tecido conjuntivo adjacente.

Em seguida, a aorta foi lavada duas vezes com HBSS, transferida para outra placa de Petri contendo 1000 µl de HBSS aquecido e cortada longitudinalmente para remoção mecânica do endotélio. Para isso, foi feito um *flush* na aorta com 500 µl de HBSS aquecido utilizando um pipetador automático de 200 µl. Em seguida, a aorta e a solução foram transferidas para um microtubo que foi mantido em estufa a 37°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, a aorta foi removida e a suspensão de células obtida foi centrifugada a 1200 rpm por 15 minutos e concentrada em 1 ml de HBSS. Após esta etapa, as células permaneceram acondicionadas em estufa (37°C) até o momento do experimento. Uma alíquota foi separada para contagem em câmara de Neubauer. O protocolo descrito está demonstrado na figura 15 a seguir.

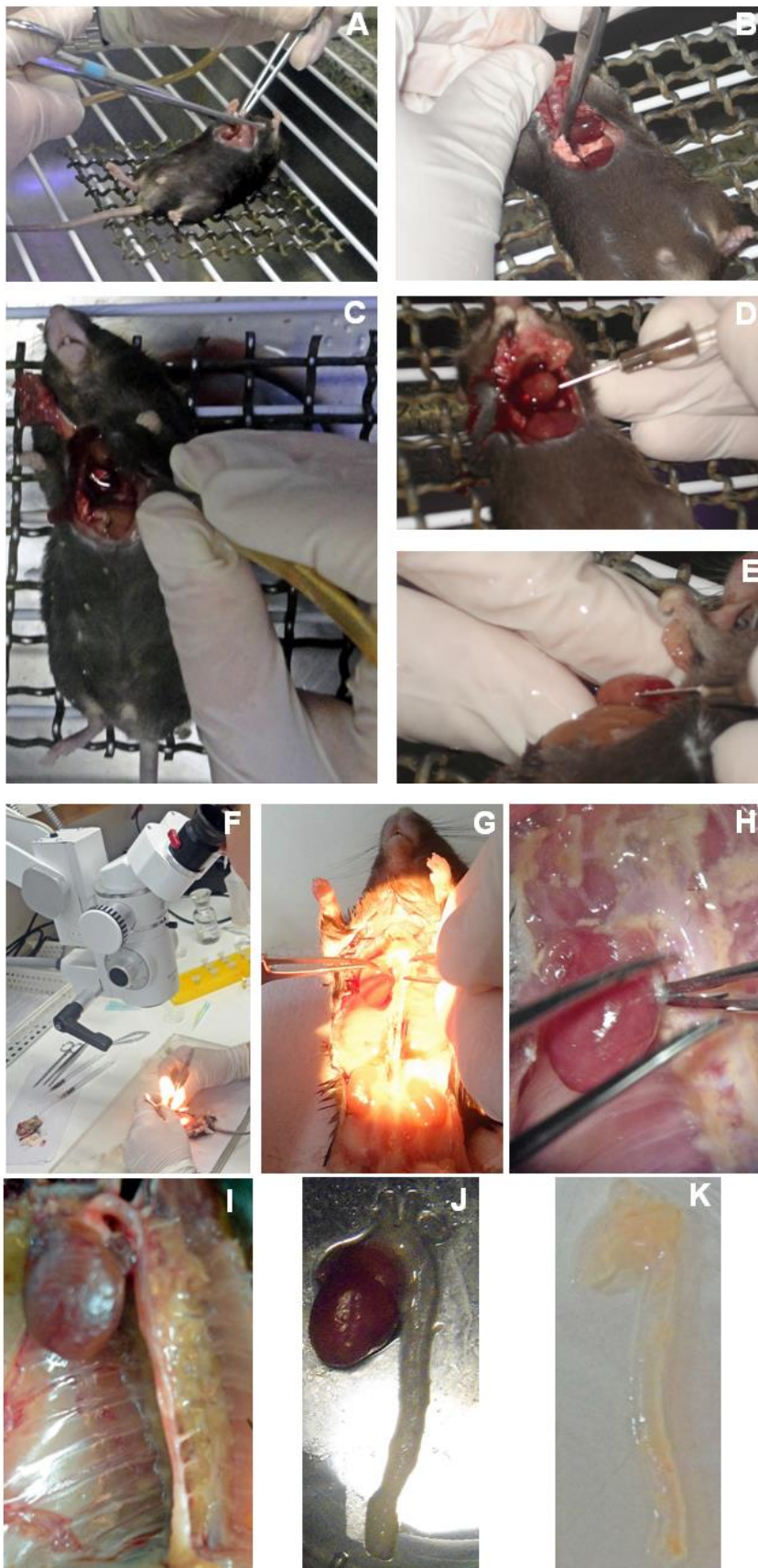


Figura 15: Isolamento da artéria aorta para coleta de células endoteliais. As figuras **A** e **B** mostram a abertura da caixa torácica. As figuras **C**, **D** e **E** mostram a agulha sendo inserida na câmara cardíaca e a perfusão com PBS. As figuras **F** e **G**

demonstram o isolamento da artéria aorta na lupa. As figuras **H** e **I** mostram a artéria aorta já isolada e dissecada. As figuras **J** e **K** mostram a aorta já removida com o coração e sem o coração respectivamente.

3.9 QUANTIFICAÇÃO EM CÂMARA DE NEUBAUER

Antes de serem submetidas à citometria de fluxo, as células de sangue, aorta e medula óssea foram contadas em câmara de Neubauer para uma correta estimativa do número de células. A contagem das células em câmara de Neubauer, também denominada de hemocitômetro, é um método manual tradicional que permite estimar o número de células por mililitros da suspensão.

A câmara de Neubauer é um tipo especial de lâmina de microscópio composta por duas câmaras de contagens separadas por uma depressão transversal. Cada câmara contém uma superfície espelhada quadriculada de dimensão 3x3 mm. A região quadriculada é dividida em nove quadrantes, cada qual de dimensão 1x1 mm. Os quadrantes utilizados para a contagem são os quatro quadrantes externos. Quando cobertos, por uma lamínula específica da câmara, cada quadrante confere um volume de $0,1\text{mm}^3$, ou 1×10^4 ml. A contagem total do número de células é realizada nos quatro quadrantes das duas câmaras de contagem. Foram feitas 3 contagens e a média do número de células foi calculado.

A câmara de Neubauer também foi utilizada para estimativa da viabilidade celular, procedimento indispensável em diferentes situações de manipulação das células. Para a contagem foi estabelecida a diluição de 40 vezes da amostra obtida, logo foram pipetados 10 ul da suspensão de 1ml de células e adicionados 90 ul de PBS. Dessa mistura foram pipetados 10 ul e adicionados em um novo microtubo contendo 10ul de azul de tripano.

Novamente foram pipetados 10ul dessa amostra e colocados em um novo tubo contendo 10ul de solução de Turk, que promove a lise das hemácias e plaquetas. Foram retirados 10 ul dessa amostra e colocados na câmara de Neubauer para contagem no microscópio óptico (Nikon) em aumento de 40X

O corante azul de tripano é usado para análise de viabilidade celular, as células mortas têm sua membrana celular danificada por isso incorporam o corante e tornam-se azuis. As células que apresentaram coloração azul escuro foram contadas como células mortas e as de coloração clara foram contadas como vivas.

Este protocolo foi realizado objetivando utilizar sempre 10^6 células nas marcações analisadas por citometria de fluxo. As amostras de sangue, aorta e medula óssea forneceram sempre 10^7 células/ml.

3.10 A CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma ferramenta que proporciona de maneira rápida e objetiva a determinação das características físicas, biológicas e químicas das células. Essa metodologia permite a análise de um grande número de células em um curto período de tempo. Portanto, todo material biológico, com tamanho entre 0,2 e 50 μ m, que contém células ou partículas em suspensão pode ser analisado por citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é uma tecnologia que mede simultaneamente e, em seguida, analisa várias características físicas das partículas individuais, geralmente células, à medida que passam pela corrente fluida através do feixe de luz. As propriedades medidas incluem o tamanho relativo de uma partícula, granulidade ou complexidade interna e intensidade de fluorescência.

Foi utilizado um citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) acoplado a um computador.. Foram adquiridos 30.000 eventos de cada amostra (10.000 eventos em triplicata) e os dados coletados foram analisados pelos *softwares* BDFACSDiva e FCSExpress (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA). No citômetro de fluxo, as células são analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulidade, e intensidade de fluorescência que é proporcional à quantidade de marcação pela sonda fluorescente utilizada (DCFH-DA, DHE, FITC, PI, APC).

Ao iniciar o citômetro, as bolhas de ar foram retiradas do sistema fluídico para evitar a aquisição de erros nas leituras das amostras. Antes de adquirir as amostras, foi utilizado o reagente CS&T (*Cytometer Setup and Tracking*; BD) para ajustar as voltagens dos tubos fotomultiplicadores e avaliar sua sensibilidade. Este reagente é utilizado para manutenção do padrão de qualidade das leituras e permite a reprodutibilidade dos resultados obtidos pelo citômetro. Além disso, após cada aquisição, foi feita a limpeza do tubo de injeção de amostra (SIT: *Sample Injection Tube*), pois pequenas quantidades de fragmentos residuais de células existentes no circuito poderiam contaminar a próxima amostra a ser processada.

Para todos os protocolos de citometria de fluxo, as células foram visualizadas em gráfico de pontos (*dot plot*) bidimensional onde foram analisados os parâmetros de tamanho ou volume relativo (FSC) e granulosidade ou complexidade interna (SSC), em escala linear, para identificação das populações celulares e exclusão de debris. Em seguida, realizou-se um *gate* eletrônico único em torno das células de interesse para excluir células inviáveis da região analisada (Figura 16). Além disso, foram feitos histogramas e *dot plots* para análise em escala logarítmica de cada marcador fluorescente utilizado em cada protocolo.

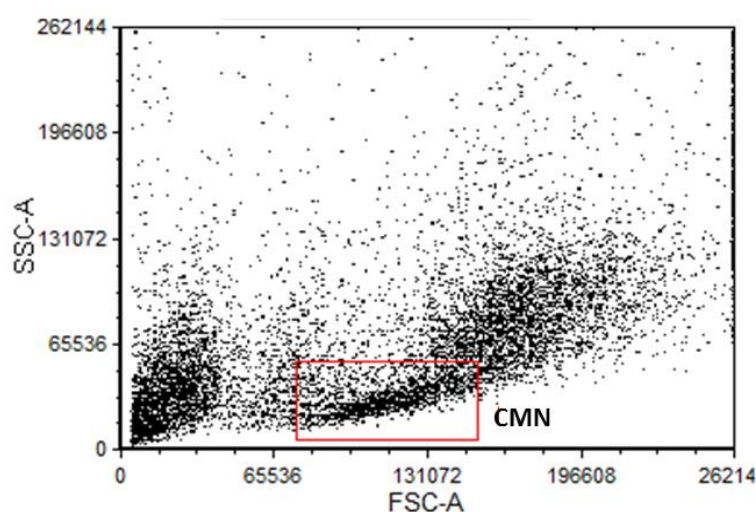


Figura 16: A figura mostra um *dot plot* típico de células totais da medula óssea, no qual há o *gate* de células mononucleares.

Cada amostra foi lida em triplicata e, de cada uma, foram adquiridos 10.000 eventos (30.000 células/animal). Os valores referentes à produção de espécies reativas de oxigênio foram avaliados por meio da média da intensidade de fluorescência emitida pela população de células analisada. Este valor é dado pelo aparelho e foi esta unidade utilizada para se avaliar a intensidade de fluorescência das células.

3.10.2 Funcionamento do Citômetro de Fluxo

Dados de fluorescência foram coletados em escala logarítmica. As fluorescências do FITC e do DCFH-DA foram captadas pelo filtro de 530/30 (530±15) nm e medidas pelo detector E (octógono); as fluorescências do PI e do DHE foram captadas pelo filtro de 585/42 (585±21) nm e medidas pelo detector D (octógono) e a fluorescência do APC foi captada pelo filtro de 660/20 (660±10) nm e medida pelo detector C (trígono). É importante destacar que nos protocolos em que foram utilizados dois marcadores simultaneamente (apoptose), foi realizada a compensação das fluorescências com o objetivo de minimizar a interferência da luz emitida e captada pelos tubos fotomultiplicadores.

3.11 IDENTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Após o isolamento das células de aorta, foi retirada uma alíquota para identificação e confirmação de células endoteliais por análise imunofenotípica para identificação de antígenos específicos expressos na superfície celular. Para isso foi utilizado o anticorpo anti-CD31 (BD/Pharmingen), fortemente expresso na superfície de células endoteliais, conjugado a alofocianina (APC). A imunoglobulina isotipo-específica, não reagente, marcada com o mesmo fluorocromo (anti-rat IgG_{2a}-APC; BD/Pharmingen) foi utilizada como controle.

Dois tubos de citometria de fluxo foram separados e identificados para cada animal. No primeiro foram colocados 5µl do anticorpo controle (IgG_{2a}-APC) e no segundo a mesma quantidade do anticorpo marcador, ou seja, 5µl de CD31-

APC. Em seguida, foram adicionadas aproximadamente 10^6 células isoladas da aorta em cada tubo e as amostras foram incubadas no escuro por 20 minutos. Decorrido este tempo, as células foram lavadas em PBS para remover o excesso de anticorpo e, por fim, foi feita a aquisição de 30.000 eventos no FACSCanto II e os dados foram analisados com auxílio do *software* BDFACSDiva (Bencton Dickinson).

3.12 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E APOPTOSE (ANEXINA)

Para determinação de viabilidade celular foi utilizada marcação com anexina V e PI, seguida de análise em citômetro de fluxo. Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina (FS). Na célula viável, estes resíduos se encontram na face interna da membrana plasmática. Entretanto, quando o processo de morte celular programada (apoptose) é iniciado, estes resíduos são rapidamente translocados para a face externa da membrana, permitindo a ligação da proteína anexina V conjugada a um fluorocromo. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, uma vez que células viáveis com membrana intacta são capazes de excluir o corante, enquanto que membranas de células mortas ou danificadas são permeáveis. Além disso, o PI é usado em conjunto com a anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial de apoptose.

O PI penetra em células, nas quais há perda da integridade da membrana celular, enquanto que células marcadas apenas com Anexina V-FITC indicam morte apoptótica. Já as células marcadas com ambos os fluorocromos representam a porcentagem de células nos estágios finais de apoptose.

Foram retiradas alíquotas de 200ul de células e estas, centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. Em seguida, ressuspendidas em 400ul de tampão *Binding Buffer* 10% (10mmol HEPES, NaOH, pH7,4, 140mmol NaCl, 2,5mmol CaCl_2) na concentração de 1×10^6 células/ml. A seguir, 100ul desta solução (1×10^5 células) foram transferidos para um novo tubo, onde receberam 2,5ul de anexina V-FITC e 2,5ul de PI. As células foram incubadas por 15 minutos, a

temperatura ambiente (25°C), na ausência de luz. Para controle positivo foi utilizado peróxido de Hidrogênio (H₂O₂). Posteriormente às marcações, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1200 rpm e por fim, 400µl de *PBS* com 10% Soro Fetal Bovino foram adicionados a cada tubo e as amostras analisadas em citômetro de fluxo FACSCantoll (BD). Este ensaio determina a proporção de células vivas (anexina V⁻/PI⁻); células em estágio inicial de apoptose onde ocorre apenas a exposição da FS na face externa da membrana plasmática com consequente marcação com a anexina V (anexina V⁺/PI⁻); células em estágio tardio de apoptose ou em necrose onde além da exposição da FS, a membrana plasmática sofre colapso e se torna permeável ao PI fazendo com que a célula possua dupla marcação (anexina V⁺/PI⁺). O resultado é um gráfico de *dot plot* com quadrantes Q1, Q2, Q3, Q4 sendo, (Figura 17): Q1: positiva apenas para PI – células com dano; Q2: Apoptose (positiva para Anexina e PI); Q3: células viáveis (negativa para Anexina e PI); Q4: apoptose precoce (Positiva para Anexina e negativa para PI). Observe na figura 24 abaixo. Para cálculo da taxa de apoptose total foram somados quadrantes Q2+Q4. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* DIVA e FCS Express 4 Flow Research Edition.

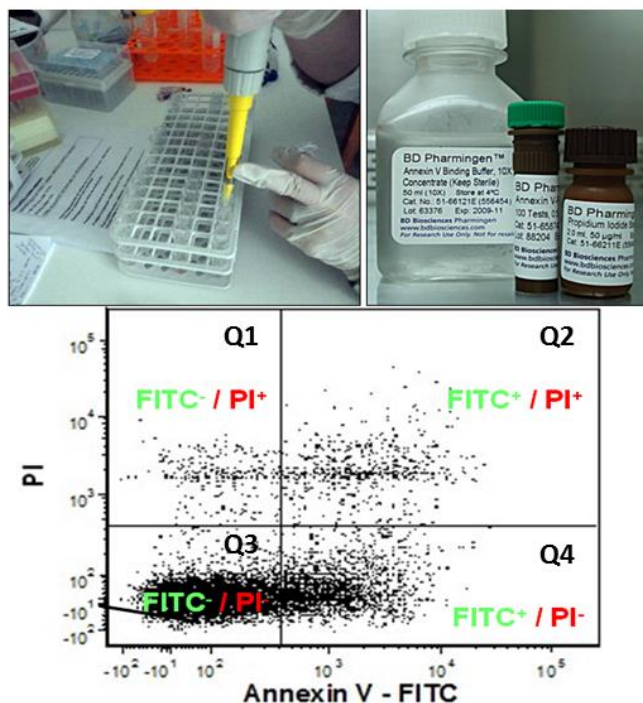


Figura 17: Representação da marcação com Anexina-FITC e gráfico típico de *dot plot* obtido da marcação com Anexina, com quadrantes Q1 (células com dano), Q2 (Apoptose), Q3 (células viáveis) e Q4 (apoptose precoce).

3.13 MEDIDA DE ESTRESSE OXIDATIVO PELA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (DHE E DCF)

Os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) foram medidos por citometria de fluxo através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF-DA) e pelo etídeo, que são produtos da oxidação do diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) e do dihidroetídeo ou hidroetidina (DHE), compostos sensíveis, principalmente, ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e aos ânions superóxido (O₂⁻), respectivamente. O H₂DCFDA é um éster, não-fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, o H₂DCFDA perde o grupo diacetato, pela ação de esterases intracelulares, resultando na formação de diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que pode ser oxidado a diclorofluoresceína (DCF), composto altamente fluorescente. Outras ERO, como óxido nítrico (NO), ânion peroxinitrito (ONOO⁻) e radical peroxil (ROO⁻) podem oxidar o DCFH. O DHE, forma reduzida do brometo de etídeo, também entra livremente na célula e é relativamente mais sensível ao O₂⁻, entretanto pode reagir com outras ERO, como o radical hidroxila (OH⁻), para formar etídeo. No citoplasma, o DHE é um fluorocromo azul (420nm), entretanto quando oxidado à etídeo, este se liga ao DNA causando a amplificação da fluorescência vermelha (518-605nm).

Para este experimento as células foram ressuspensas em 1ml de PBS na concentração de 1x10⁶ células/ml. As amostras foram incubadas, no escuro, com 20ul de solução de DCF-DA (20mM) e 20 ul de DHE (1,25mM), por 30 minutos à 37°C e, em seguida centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 400ul de PBS com 10% de SFB. A aquisição dos dados foi realizada com citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com laser de 488nm. Os sinais foram obtidos utilizando filtros de 585nm para etídeo e 530nm para DCF-DA. O controle positivo foi obtido a partir de células incubadas com 50µM H₂O₂ por 5 minutos, enquanto que para o controle negativo, as amostras celulares foram incubadas apenas em PBS. A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* DIVA, pela determinação da intensidade média de fluorescência de 10.000 células.

3.13.1 Análise de DHE em cortes histológicos de aorta

Foi utilizada marcação das células com Dihidroetídeo para detecção de ânions superóxido. Uma vez internalizada a hidroetidina é desidrogenada em etídeo, que é um intercalante de DNA. O DHE quando em contato com o ânion superóxido forma um produto fluorescente vermelho (etídeo).

Para detecção da produção de ânions superóxido as lâminas foram lavadas com solução de Krebs-Hepes para remover o OCT e incubadas nesta mesma solução por 30 minutos a 37°C cobertas com parafilme para impedir o ressecamento.

Após esse procedimento as lâminas foram secas com auxílio de um secador e posteriormente incubadas com solução de DHE por 30 minutos a 37°C. As lâminas foram então seladas com solução de montagem e visualizadas em microscópio de fluorescência no comprimento de onda de 563nm. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon Ti-S, EUA) equipado com filtro de comprimento de onda de 585nm (G-2E/C; Nikon, EUA) e câmera digital (Ds-Ri1; Nikon, EUA), e os dados de intensidade média de fluorescência analisados utilizando o *software Nis Elements* (Nikon, EUA).

3.14 ENSAIO DO COMETA PARA ANÁLISE DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

A eletroforese alcalina em gel de única célula (SCG – *single cell gel*), conhecida como ensaio do cometa é usada para investigar a genotoxicidade de produtos químicos industriais, biocidas, agroquímicos e farmacêuticos. Ostling e Johanson desenvolveram a técnica em 1984 usando um pH neutro que limitava seus experimentos (Ostling & Johanson, 1984). Porém Singh em 1988 aprimorou a técnica utilizando o pH >13 básico que aumenta a velocidade de migração do DNA. (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000).

O princípio básico do ensaio do cometa é a migração da molécula de DNA em

um gel de agarose em condições de eletroforese. Quando vista no microscópio, a célula tem a aparência de um cometa, com uma cabeça (região do núcleo) e uma cauda contendo fragmentos de DNA que migram em direção ao pólo positivo.

Dentre os vários protocolos, o que apresentou melhor resultado foi o de pH > 13, pois possibilita detectar no DNA quebras de fita simples e dupla, sítios abásicos, *crosslinks* de DNA/DNA e DNA/Proteínas entre outros.

O ensaio do cometa pode ser aplicado em qualquer tipo de tecido desde que as células tenham núcleo. Ratos e camundongos são as espécies mais utilizadas neste tipo de experimento. Os passos básicos do ensaio incluem preparação das lâminas de microscópio embebidas em agarose, lise das membranas celulares para que haja liberação do DNA, desenovelamento da fita de DNA, eletroforese, neutralização, marcação do DNA e análise.

Todos os reagentes utilizados no experimento foram preparados frescos e todo procedimento foi realizado em ambiente com pouca luz para evitar danos ao DNA das células, uma vez que estes estavam expostos e sujeitos a ação de enzimas.

Foram utilizadas lâminas de microscópio convencionais com a ponta fosca para identificação. Antes de começar o experimento as lâminas foram higienizadas com álcool 70% e secas com um papel macio. A agarose *Normal Melting* (NMA - GIBCO) foi preparada na concentração de 1,5% em PBS e colocada sobre a lâmina com auxílio de uma pipeta de 1ml. As lâminas cobertas com agarose foram levadas à geladeira para secar por até 24 horas. Após a secagem das lâminas foram colocadas sobre elas uma mistura de células (5ul) com a agarose especial (75ul), de baixo ponto de fusão – *Low Melting Point* (LMP-GIBCO, 0,5%) preparada cuidadosamente em banho-maria (37°C). Por fim, foram colocadas as lamínulas e as lâminas foram mantidas em geladeira para secagem (4°C).

Após a solidificação da agarose em geladeira, as lamínulas foram gentilmente retiradas e as lâminas foram colocadas em uma cuba vertical (Figura 25)

contendo solução de lise (100mM de EDTA, 2,5M de cloreto de sódio e 10mM de Tris-base / 1% de Triton e 10% de DMSO adicionados na hora do uso, pH 10), que tem como objetivo lisar as membranas plasmáticas e nucleares das células, expondo o DNA.

A cuba foi mantida na geladeira por no mínimo 1 hora. A solução de lise foi mantida gelada desde o início do procedimento para evitar o descolamento do gel de agarose nas lâminas.

Após a etapa de lise as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese horizontal contendo solução tampão de eletroforese (1mM de EDTA e 300mM de hidróxido de sódio, pH >13), por 20 minutos, em ambiente escuro, com o objetivo de descondensar a molécula de DNA antes de ser submetida a corrida. Após o desenovelamento das fitas de DNA, a cuba foi ligada e a eletroforese transcorreu a 25V e 300mA, por um período de 25 minutos a baixa temperatura e protegida da luz.

Após a eletroforese as lâminas foram retiradas da cuba e colocadas em um recipiente contendo solução de neutralização (Tris-base pH 7,5) por 5 minutos. Ao fim dos 5 minutos as lâminas foram transferidas para outro recipiente contendo água destilada por 5 minutos, a água é necessária para retirada do excesso de solução de neutralização. Este procedimento foi repetido três vezes.

As lâminas foram colocadas para secar por 2 horas na estufa a 37°C ou *overnight*. No dia seguinte foram fixadas com metanol por 2 minutos para serem coradas com brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência.

Em cada lâmina foram adicionados 70ul de Brometo de Etídio a 2ug/ml, cobertas com lamínulas. As lâminas coradas foram armazenadas em um recipiente resfriado e protegido da luz e levadas imediatamente para análise em Microscópio de Fluorescência (Nikon Ti-S, USA).

No microscópio de fluorescência foram contadas aleatoriamente, em um campo

pré-estabelecido, 100 células por cada lâmina, sendo que foram montadas para cada animal três lâminas. Destes dados calculamos a média.

A contagem das células com danos no DNA foi feita de maneira qualitativa observando-se o tamanho da cauda do cometa. Os danos no DNA foram classificados por cinco níveis de fragmentação de DNA: 0, 1, 2, 3 e 4.

Sendo:

Nível 0 – Sem fragmentação de DNA

Nível 1 – Nível baixo de fragmentação

Nível 2 – Nível moderado de fragmentação

Nível 3 – Nível alto de fragmentação de DNA

Nível 4 – Severo

Foi calculado o Score através da somatória dos danos encontrados multiplicando cada classe de dano pelo número de células com o dano correspondente encontrado em cada animal.

Exemplo:

Score = Exemplo: animal ApoE idoso - $0 \times 30 + 1 \times 24 + 2 \times 87 + 3 \times 114 + 4 \times 45 = 720$

Foram feitas as médias de cada animal para posteriormente calcular a média geral. Também foi calculado o percentual de danos em cada classe (0,1,2,3 e 4).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados estão expressos como média±EPM. Para análise estatística, foi utilizado o teste ANOVA de 2 vias, seguido do *post hoc* de Fisher, com * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 COLESTEROL PLASMÁTICO

Com o objetivo de demonstrar que o modelo ApoE-KO apresenta hipercolesterolemia, o colesterol plasmático total foi dosado utilizando kit comercial da Bioclin. Conforme esperado, os camundongos ApoE-KO idosos apresentaram níveis elevados de colesterol total em comparação ao grupo C57 idoso (ApoE-KO idosos 517mg/dl vs C57 idosos 91,42mg/dl). Ainda, os animais ApoE-KO jovens apresentaram também maiores níveis de colesterol que os C57 jovens (ApoE-KO jovens 456,14mg/dl vs C57 jovens 71,85mg/dl). Na comparação intragrupo, não observamos diferença no nível de colesterol entre ApoE-KO idosos e ApoE-KO jovem (ApoE-KO jovens 456,14mg/dl vs ApoE-KO idosos 517mg/dl), assim como também não observamos diferença entre grupo C57 idoso e C57 jovem (C57 jovens 71,85mg/dl vs C57 idosos 91,42mg/dl). Os dados estão representados pela figura 18.

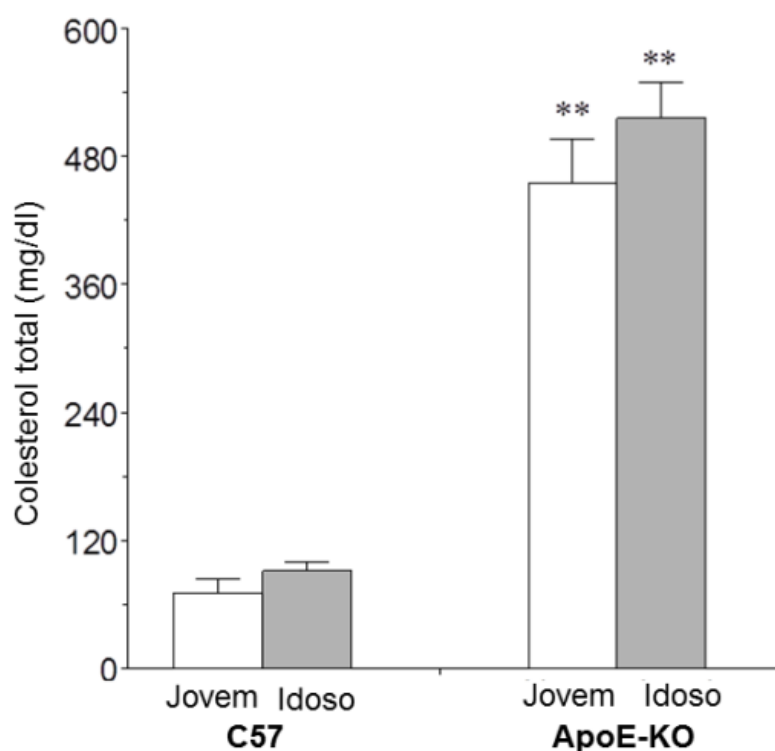


Figura 18: Níveis comparativos de colesterol total plasmático em camundongos jovens e idosos C57 e ApoE-KO alimentados com dieta regular. Barras brancas representam animais jovens C57 e ApoE-KO. Barras cinza representam animais idosos C57 e ApoE-KO. Os valores indicam média±EPM. ** p<0,01 vs. C57 Jovem e

Idoso (Anova 2 vias, seguida de *post hoc* de Fisher).

4.2 NÍVEL DE GLICOSE NO SANGUE

Os níveis de glicose encontrados nos grupos foram similares e não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ApoE-KO jovens e idosos (95 ± 12 vs. 108 ± 9 mg/dL, respectivamente) e entre C57 jovens e idosos (75 ± 2 vs. 89 ± 6 mg/dL, respectivamente). Estes valores podem ser observados na tabela 1, a seguir.

Tabela 1: Valores de glicose sanguínea dos animais.

Glicose (mg/dL)	
C57 2 meses	75±2
C57 18 meses	89±6
ApoE-KO 2 meses	95±12
ApoE-KO 18 meses	108±9

Nota: Valores expressos como média±EPM (Anova 2 vias, *post hoc fisher*).

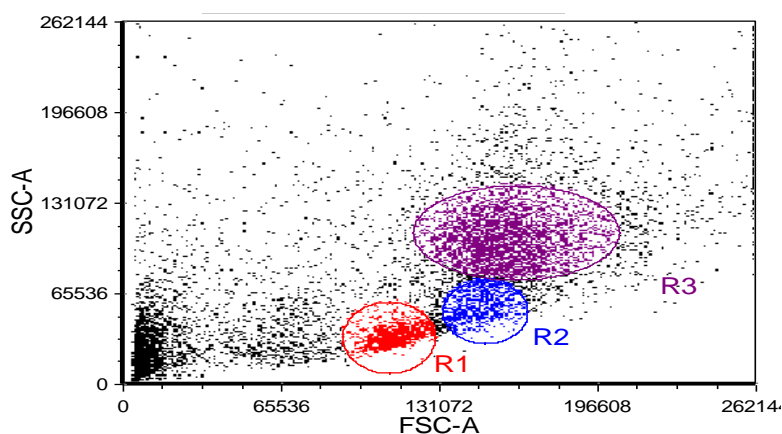
4.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR APÓS ISOLAMENTO E CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

A análise da viabilidade celular foi feita pelo método de exclusão do corante azul de tripano. As células vivas e mortas foram contadas e foi calculado o percentual de viabilidade. Conforme esperado, todas as células (provenientes de medula, sangue e aorta) apresentaram viabilidade superior a 95%. A média das células de ApoE-KO de 2 e 18 meses de idade tinham $95.2 \pm 1,28$ vs $97.9 \pm 0,72$ % de viabilidade. A média das células dos C57 com as mesmas idades apresentou viabilidade de $95.4 \pm 0,87$ vs $96.1 \pm 0,56$ %.

4.4 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras coletadas de sangue, medula e aorta utilizadas para os protocolos de citometria de fluxo, foram analisadas no tempo máximo de 2 horas para que não houvesse perda das espécies reativas de oxigênio. Os dados foram coletados em triplicata e os resultados apresentados representam a média das três leituras realizadas pelo citômetro de fluxo. Apresentaremos *dot plots* típicos (Figura 19) dos dados referentes ao tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) de células do sangue (A), medula óssea (B) e aorta (C) de camundongos. As populações celulares de interesse foram identificadas através de *gates* eletrônicos coloridos. Nas amostras de sangue e medula óssea podemos identificar linfócitos (R1), monócitos (R2) e granulócitos (R3), enquanto que na amostra de aorta podemos identificar células endoteliais (R4). Nas amostras de sangue foram avaliadas concomitantemente as três populações celulares, já nas células de medula óssea foram avaliadas as células mononucleares (R1 + R2) enquanto que nas amostras de aorta, apenas as células endoteliais (R4) foram analisadas.

A)



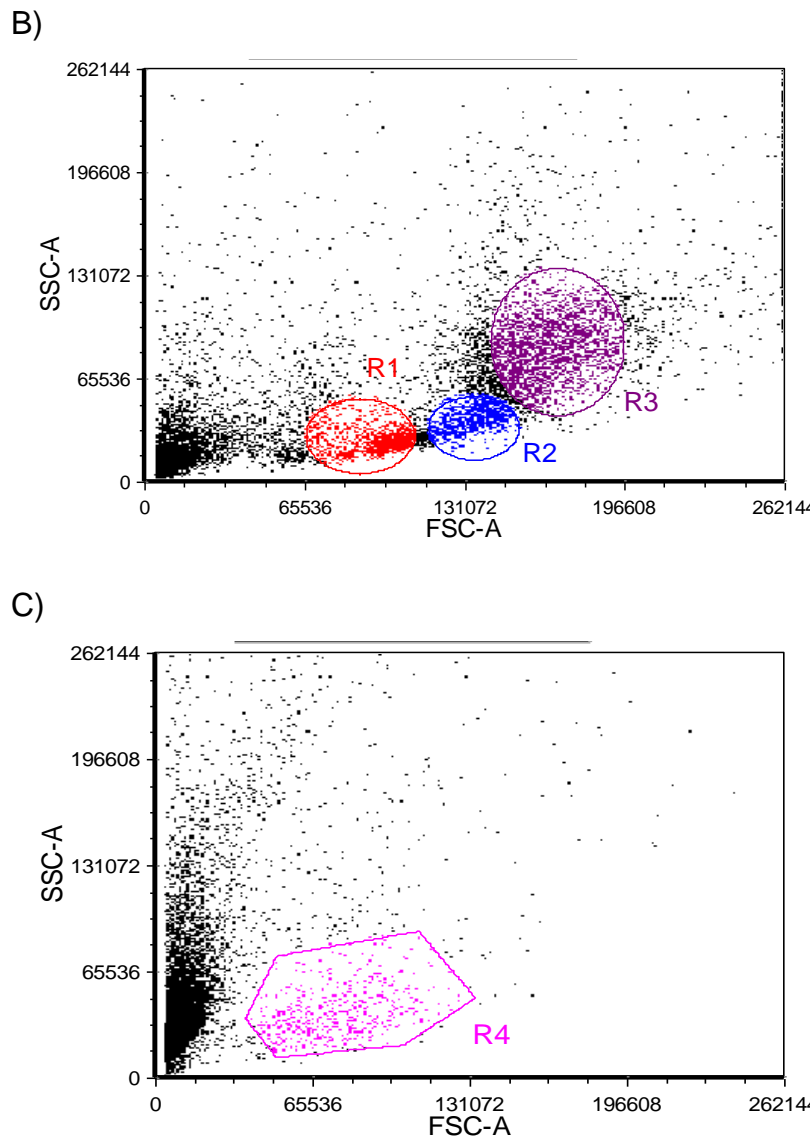


Figura 19: *Dot plots* ilustrativos de células de sangue (A), medula óssea (B) e aorta (C) de camundongos, com populações celulares específicas destacadas por *gates*. R1 (vermelho): linfócitos; R2 (azul): monócitos; R3 (roxo): granulócitos; R4 (rosa): células endoteliais. FSC (*Forward Scatter*) - Tamanho; SSC (*Side Scatter*) – Granulosidade.

Vale ressaltar que os histogramas e *dot plots* apresentados tem por objetivo apenas ilustrar o que foi observado durante as análises por citometria de fluxo, ou seja, as populações celulares típicas e suas diferentes respostas de intensidade de fluorescência obtidas para cada grupo estudado.

4.5 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO, APOPTOSE E DANO AO DNA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA

4.5.1 Porcentagem de Células Mononucleares no *gate* morfológico

As células mononucleares foram isoladas da medula óssea dos animais, conforme já citado, e para análise das células no citômetro de fluxo foi feito um *gate* na região que continha as células mononucleares, de acordo com parâmetros conhecidos de tamanho e granulosidade. Foi calculado o percentual de CMN e encontramos valores similares nos *gates* em todos os grupos, conforme demonstra a tabela a seguir.

Tabela 2: A tabela mostra o percentual de células no *gate* de células mononucleares da medula óssea nos grupos C57 jovens (2 meses) e idosos (18 meses) e ApoE-KO jovens e idosos.

PERCENTUAL DE CMN	
C57 2 MESES	13,68±1,3
C57 18 MESES	15,17±0,91
APOE-KO 2 MESES	17,8±2,18
APOE-KO 18 MESES	14,84±0,3

Nota: Os valores indicam média±EPM.

4.5.2 Intensidade Média de Fluorescência de Dihidroetídeo nas células mononucleares de medula óssea

A quantidade de ânions superóxido produzidos foi medida pelo ensaio de dihidroetídeo na citometria de fluxo. O grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentaram maiores níveis de ânion superóxido (O_2^-) quando comparados com os animais ateroscleróticos jovens (ApoE-KO idoso: 39.806±1.578 vs ApoE-KO jovem: 8.734±1.005), conforme demonstrado pelo gráfico 4, o que equivale ao aumento de 5 vezes na produção de ânion superóxido nos animais idosos em relação aos jovens. O grupo C57 idoso apresentou maior intensidade média de fluorescência quando comparado com o grupo C57 jovem (C57 idoso: 19.363±3.162 vs C57 jovem: 2.300±128), que

equivale ao aumento de 8 vezes da produção de ânion superóxido em relação aos C57 jovens. Encontramos também aumento significativo da intensidade média de fluorescência para ânion superóxido no grupo ApoE-KO idoso quando comparado com o grupo C57 idoso (ApoE-KO idoso: 39.806 ± 1.578 vs C57 idoso: 19.363 ± 3.162) (Figura 20). Os típicos de histogramas estão representados na figura 21.

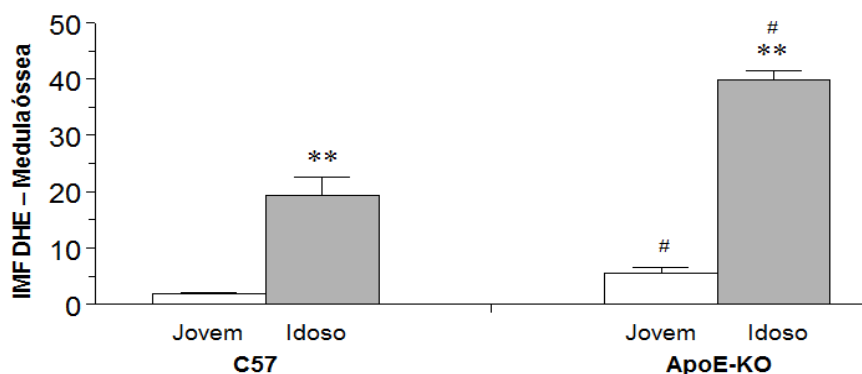
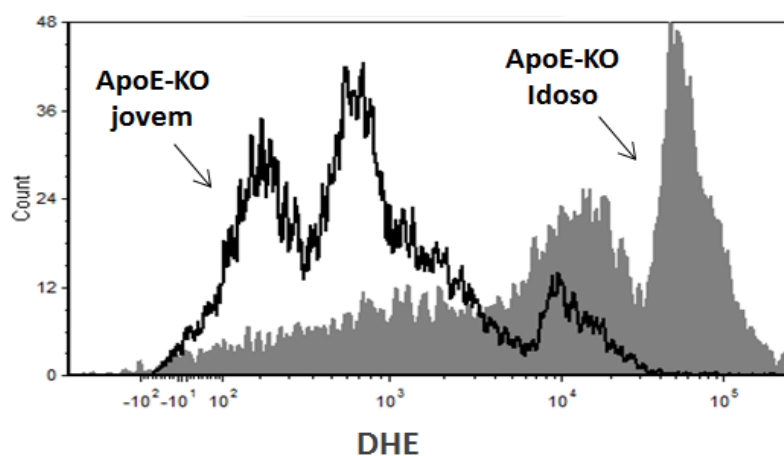


Figura 20 - Intensidade média da fluorescência de DHE nas células de medula óssea em grupos jovens e idosos de C57 e ApoE-KO. Barras brancas representam grupos C57 e ApoE-KO jovens (2 meses); barras cinza representam grupos C57 e ApoE-KO idosos (18 meses). Os valores indicam IMF \pm EPM de experimentos realizados em triplicata (unidades arbitrárias; x1000). ** p<0,01 vs jovens e # p<0,05 vs mesma idade (Anova 2 vias com *post hoc* de Fisher).



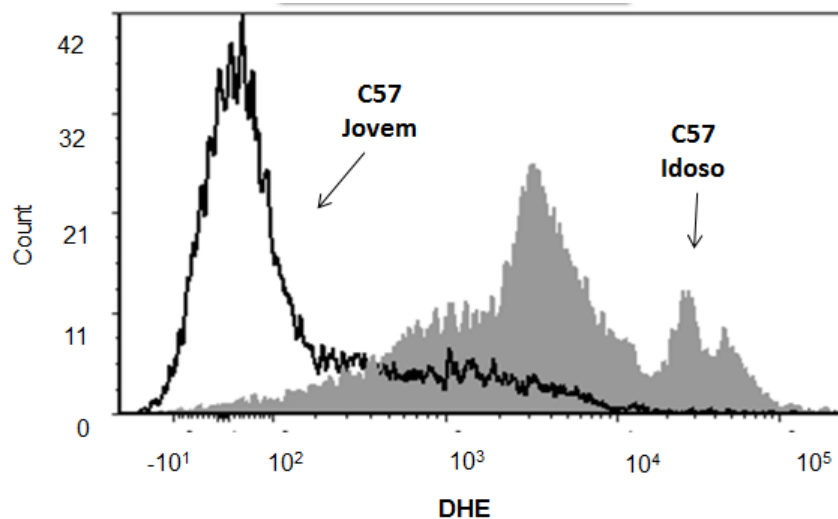


Figura 21: Histogramas típicos de intensidade média de fluorescência de dihidroetídeo em células mononucleares de medula óssea dos grupos idosos e jovens. Picos vazios (branco): ApoE-KO e C57 jovens, respectivamente. Picos cheios (cinza): ApoE-KO e C57 idosos, respectivamente. Os gráficos são típicos representativos de um animal.

4.5.3 Intensidade Média de Fluorescência de DCF-DA nas células mononucleares de medula óssea

A intensidade média de células positivas para ânions peróxido foi quantificada pelo dihidroclorofluoresceína (DCF-DA) em citometria de fluxo. O grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentou maior intensidade de peróxido de hidrogênio quando comparados com os animais ateroscleróticos jovens (ApoE-KO idoso: 13.206 ± 542 vs ApoE-KO jovem: 10.432 ± 262) (Figura 22). Observamos que os animais ateroscleróticos jovens já apresentavam nível elevado de peróxido de hidrogênio logo no início da lesão. O grupo C57 idoso apresentou maior nível de peróxido de hidrogênio quando comparado com o grupo C57 jovem (C57 idoso: 8.700 ± 500 vs C57 jovem: 1.900 ± 401). Percebemos também aumento significativo quando comparamos o grupo ApoE-KO jovem e C57 jovem, sugerindo que mesmo em estágio inicial de lesão, a aterosclerose já causa aumento na produção de peróxido de hidrogênio que afeta as células de medula óssea. Também foi encontrado aumento significativo na produção de peróxido de hidrogênio na medula óssea dos animais ateroscleróticos idosos quando comparados com os animais C57 idosos (ApoE-KO idoso: 13.206 ± 542 vs C57 idoso: 8.700 ± 500)

sugerindo maior acometimento das células de medula óssea marcadas para peróxido de hidrogênio nos animais idosos e ateroscleróticos. Os típicos de histograma estão representados pela figura 23.

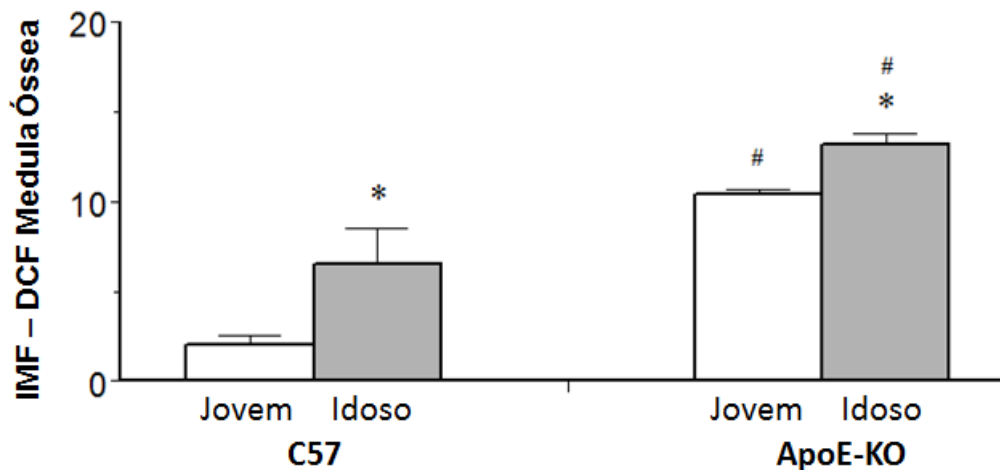
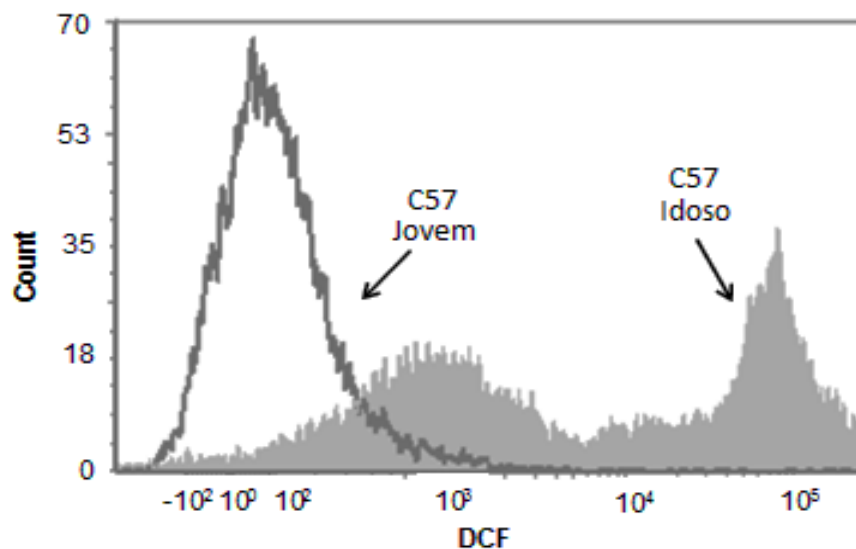


Figura 22: Intensidade média de fluorescência de DCF nas células mononucleares de medula óssea em animais ateroscleróticos e controle. Barras brancas representam grupos C57 e ApoE-KO jovens (2 meses); barras cinza representam grupos C57 e ApoE-KO idosos (18 meses). Os valores indicam IMF±EPM (Unidades arbitrárias; x1000). * $p < 0,05$ vs jovens e # $p < 0,05$ vs mesma idade (Anova duas vias, *post hoc* Fisher).



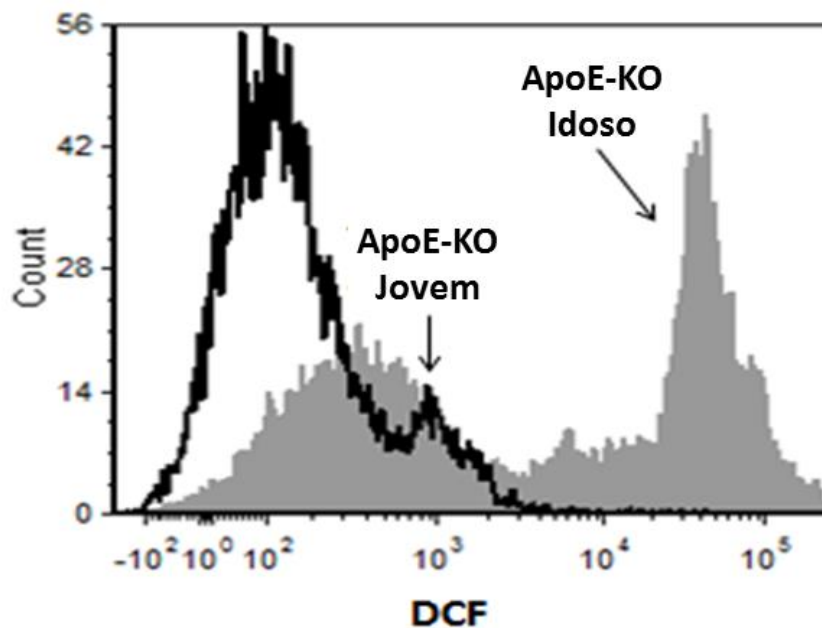


Figura 23: Histogramas típicos de intensidade de DCF-DA por citometria de fluxo nas células de medula óssea dos grupos idosos e jovens. Picos vazios (branco): C57 e ApoE-KO jovens, respectivamente. Picos cheios (cinza): C57 e ApoE-KO idosos, respectivamente. Os gráficos são típicos representativos de um animal.

4.5.4 Quantificação de Apoptose nas células mononucleares de medula óssea

Para identificar o percentual de células em apoptose, foi investigada a exposição da fosfatidilserina utilizando Anexina-V fluorescente e Iodeto de propídeo (PI) que são marcadores de células em apoptose. As células em apoptose apresentam fosfatidilserina translocada da face interna para externa da membrana celular. A Anexina-V é uma proteína que possui alta afinidade para fosfatidilserina e foi conjugada ao fluorocromo FITC para marcação. Também foi utilizado o corante vital PI. Células viáveis com membranas intactas não são permeáveis para PI enquanto que células não viáveis permeabilizam PI.

A análise do teste de Anexina V-PI mostrou que o grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentaram maiores percentuais de células em apoptose quando comparados com os animais ateroscleróticos

jovens (ApoE-KO idoso: $21,3 \pm 4,8$ vs ApoE-KO jovem: $6,0 \pm 1,2\%$), o que equivale a um aumento de aproximadamente 3 vezes no percentual de apoptose. O grupo C57 idoso apresentou maior percentual de apoptose quando comparado com o grupo C57 jovem (C57 idoso: $9,6 \pm 0,6$ vs C57 jovem: $5,6 \pm 0,6\%$), que equivale a um aumento de 2 vezes no percentual de células em apoptose, durante o envelhecimento. A análise comparativa entre os grupos idosos (C57 vs ApoE-KO) mostrou maior percentual de células em apoptose nos animais ateroscleróticos idosos quando comparados com os animais controle idosos (ApoE-KO idoso: $21,3 \pm 4,8$; C57 idoso: $9,6 \pm 0,6\%$), sugerindo que a aterosclerose concomitante com o envelhecimento agrava o nível de apoptose nas células mononucleares de medula óssea. Também encontramos diferença significativa entre os grupos jovens. Os dados estão representados no figura 24 e figura 25 representativa dos típicos de *dot plot*.

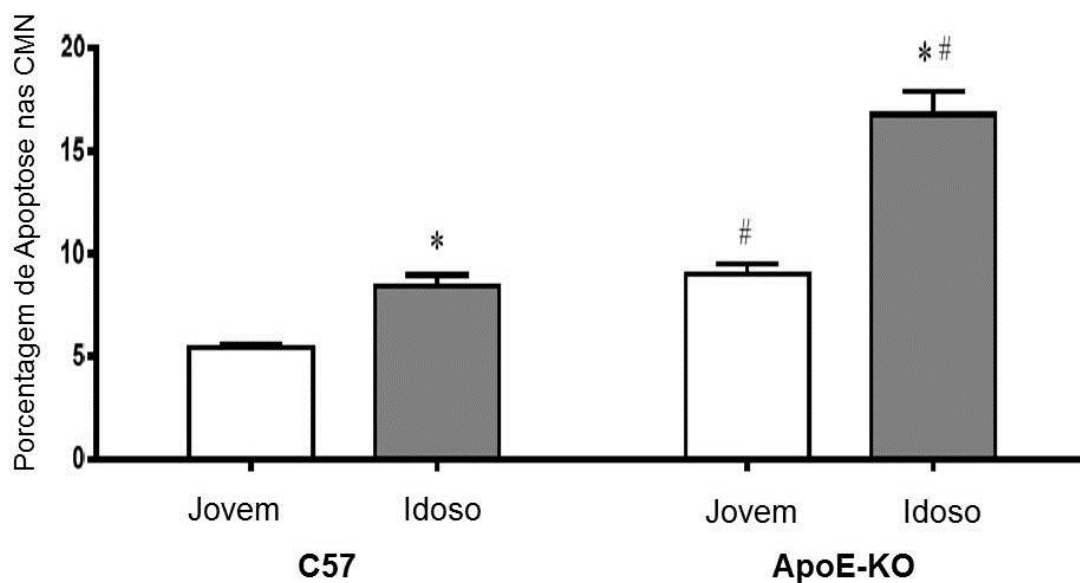


Figura 24: Gráfico de barras mostrando a porcentagem de apoptose celular (Anexina V-PI) nas células mononucleares de medula óssea de animais C57 e ApoE-KO. Sendo, barras brancas grupos C57 e ApoE-KO jovens, barras cinza grupos C57 e ApoE-KO idosos. Os valores indicam percentuais realizados em triplicata de média \pm EPM (Anova 2 vias com *post hoc* Fisher). * $p < 0,05$ vs jovem ; # $p < 0,05$ vs mesma idade.

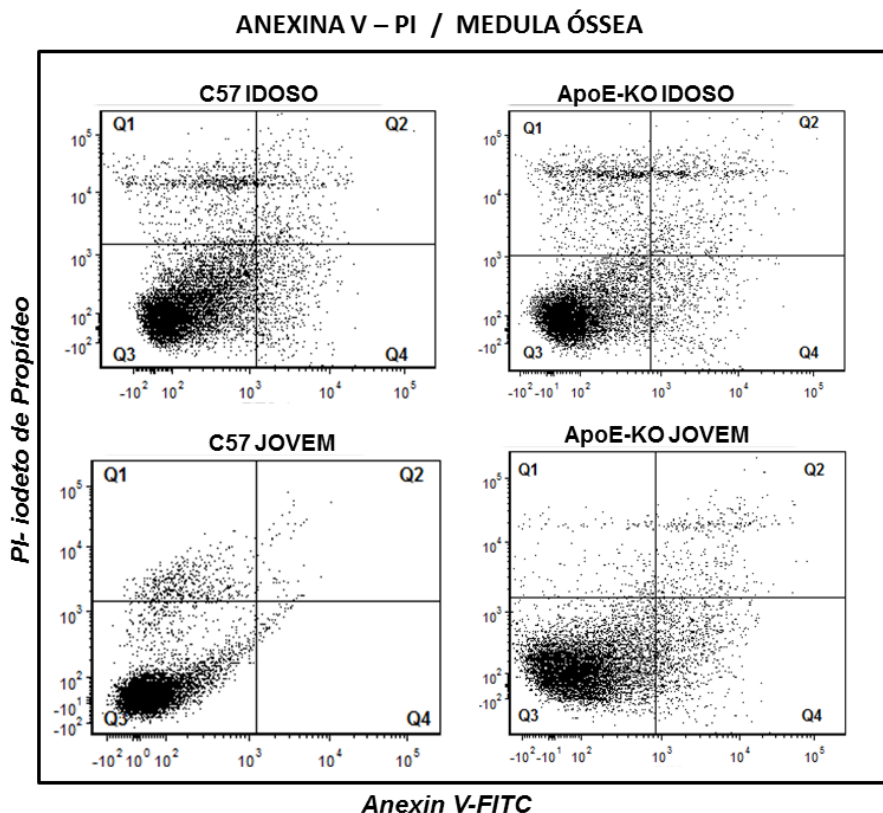


Figura 25: *Dot plots* típicos obtidos da análise de apoptose por teste de Anexina-V PI em células mononucleares de medula óssea de animais C57 e ApoE-KO jovens e idosos. Percebe-se um aumento da quantidade de eventos em Q2 nos animais idosos. Sendo Q1: positiva apenas para PI – células com dano; Q2: Apoptose (positiva para Anexina e PI); Q3: células viáveis (negativa para Anexina e PI); Q4: apoptose precoce (Positiva para Anexina e negativa para PI).

4.5.5 Níveis de fragmentação do dna das células mononucleares de medula óssea pelo ensaio do cometa

A fim de demonstrar os níveis de fragmentação do DNA das células mononucleares de medula óssea, utilizamos o ensaio do cometa, uma técnica muito eficiente e sensível para detecção de danos oxidativos. Os resultados do ensaio do cometa revelaram que os animais ateroscleróticos de 18 meses de idade tem maiores níveis de fragmentação no DNA (níveis 3 e 4 de fragmentação) que o seu controle C57 de 18 meses de idade (ApoE-KO idoso: 734 ± 8 vs C57 idoso: 602 ± 15). Também observamos que os animais ApoE-KO jovens tinham maior índice de fragmentação do DNA que os animais C57 jovens (ApoE-KO jovem: 525 ± 6 vs C57 jovem: 356 ± 8), sugerindo que mesmo

em estágios iniciais, a aterosclerose já leva ao aumento de fragmentação de DNA. Também encontramos maiores níveis de fragmentação de DNA nos animais C57 idosos quando comparados com C57 jovens (C57 jovem: 356 ± 8 vs C57 idoso: 602 ± 15) e nos animais ateroscleróticos idosos quando comparados com os animais ateroscleróticos jovens (ApoE-KO jovem: 525 ± 6 vs ApoE-KO idoso: 734 ± 8) (Figura 27). Além disso, ao analisar o percentual de células com danos em cada nível de fragmentação do DNA, observamos que os animais C57 idosos apresentaram percentual elevado de danos nível 2 e 3 em comparação com o C57 jovem (C57 idoso: $45 \pm 1,5$ e $30 \pm 2,7$ vs C57 jovem: $26 \pm 1,2$ e $6 \pm 0,2\%$). Os animais ApoE-KO idosos apresentaram percentual elevado de níveis 3 e 4 quando comparado com ApoE-KO jovens (ApoE-KO idoso: $35 \pm 1,4$ e $18 \pm 1,4$ vs ApoE-KO Jovem: $17 \pm 1,2$ e $3 \pm 0,6\%$) (Figura 26).

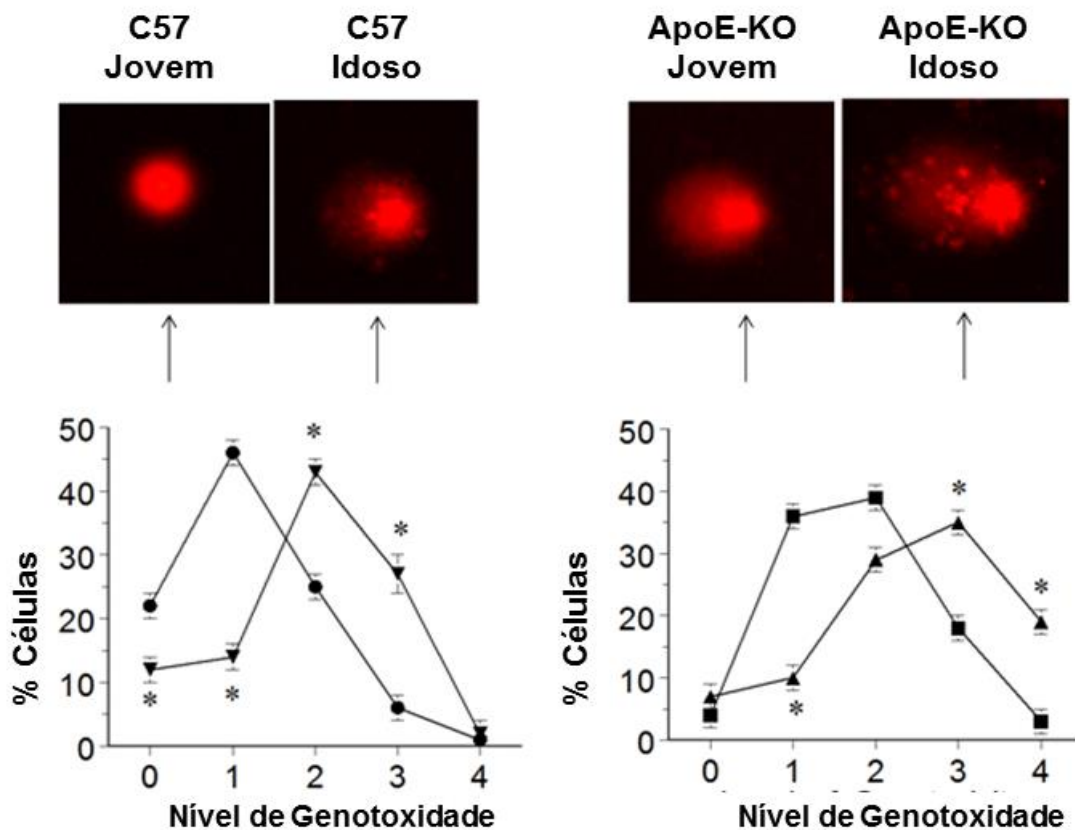


Figura 26: Fotos típicas do DNA fragmentado de animais jovens e idosos de C57 à esquerda e ApoE-KO à direita, com respectivos gráficos percentuais de danos. Podemos observar aumento da fragmentação de DNA nos animais ApoE-KO de 18 meses quando comparado com os C57. Bolinha: C57 Jovens; Triângulos para baixo: C57 idosos; Quadrados: ApoE-KO jovens e Triângulo para cima: ApoE-KO idosos.

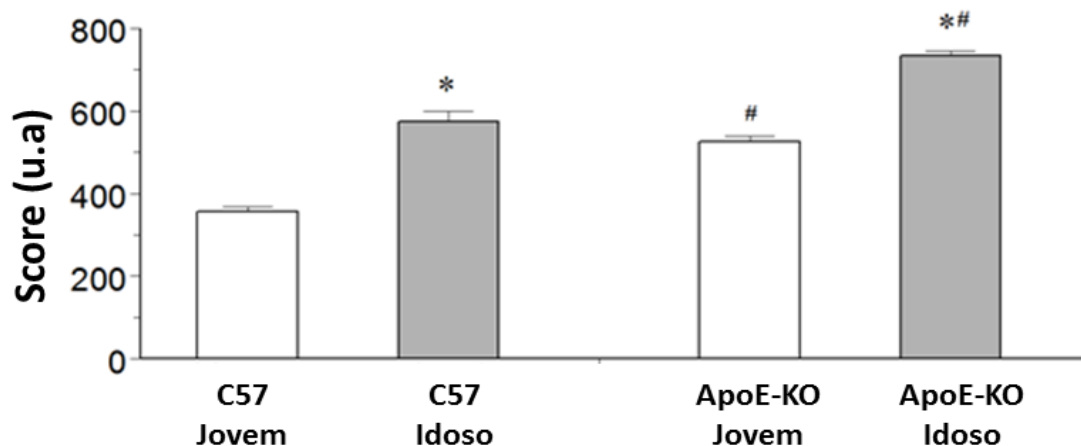


Figura 27: Score dos danos no DNA. Barras cinzas representam animais idosos (18 meses) e barras brancas representam animais jovens (2 meses). Os valores indicam média±EPM. * $p < 0,05$ vs. jovens e # $p < 0,05$ vs mesma idade. (Anova 2 vias, *post hoc* Fisher)

4.6 ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

4.6.1 Intensidade Média de Fluorescência de Dihidroetídeo nas células Sanguíneas

O grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentaram maior produção de ânion superóxido (O_2^-) quando comparados com os animais ateroscleróticos jovens (ApoE-KO idoso: 8.793 ± 1.463 vs ApoE-KO jovem: 2.549 ± 55), o que equivale ao aumento de 3 vezes na produção de ânion superóxido dos animais ApoE-KO idosos. O grupo C57 idoso apresentou maiores níveis de ânion superóxido quando comparado com o grupo C57 jovem (C57 idoso: 5.387 ± 679 vs C57 jovem: 2.309 ± 249), logo sugerindo que o envelhecimento, por si só, aumentou em 2 vezes a produção de ânion superóxido no sangue destes animais. O grupo ApoE-KO idoso apresentou maior produção de ânion superóxido quando comparado com o grupo C57 idoso (ApoE-KO idoso: 8.793 ± 1.463 vs C57 idoso: 5.387 ± 679), ou seja, a aterosclerose é determinante para o aumento da produção de ânion superóxido no sangue e quando concomitante com o envelhecimento, este quadro se

agrava mais ainda, conforme podemos observar na figura 28 e histogramas típicos da figura 29.

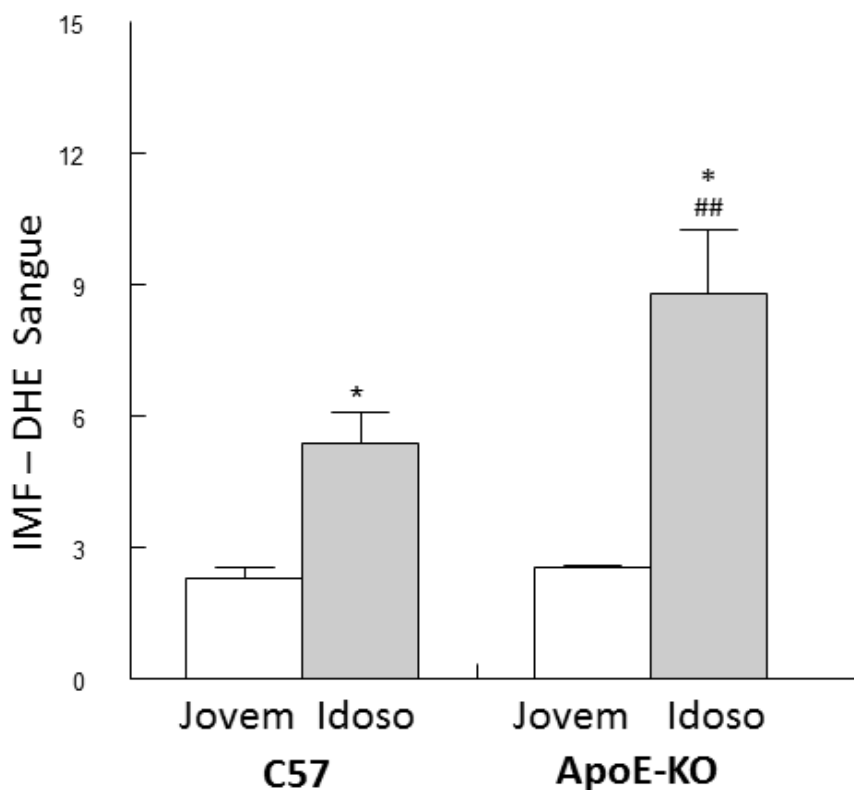


Figura 28: Intensidade média de fluorescência de DHE nas células de sangue de animais jovens e idosos C57 e ApoE-KO. Barras brancas representam grupos C57 e ApoE-KO jovens (2 meses); barras cinza representam grupos C57 e ApoE-KO idosos (18 meses). Os valores indicam $IMF \pm EPM$ (u.a x1000) de experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs jovens; ## $p < 0,01$ vs mesma idade.

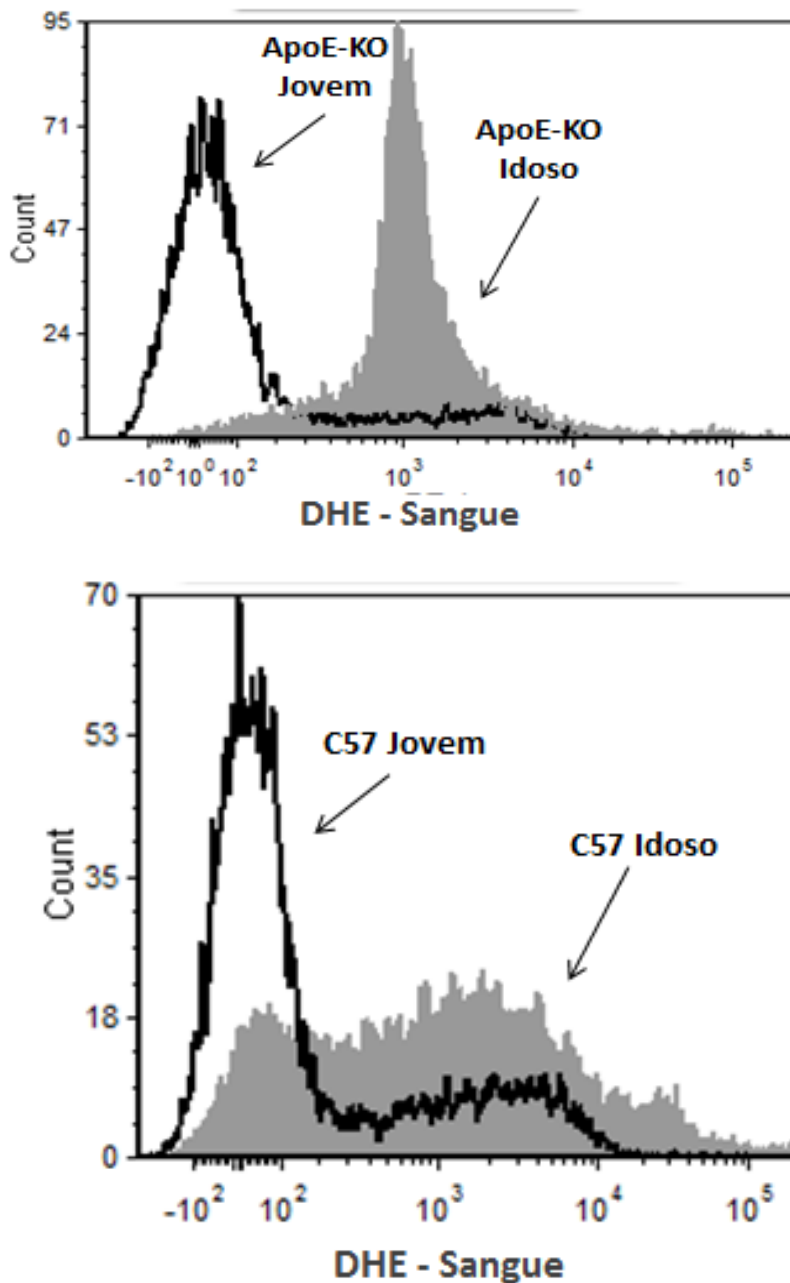


Figura 29: Histogramas típicos de intensidade de DHE por citometria de fluxo nas células sanguíneas de animais idosos e jovens. Picos vazios (branco): ApoE-KO e C57 jovens, respectivamente. Picos cheios (cinza): ApoE-KO e C57 idosos, respectivamente. Os gráficos são típicos representativos de um animal.

4.6.2 Intensidade Média de Fluorescência de DCF-DA nas células sanguíneas

O grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentaram maiores níveis de peróxido de hidrogênio quando comparados com os animais

C57 idosos (ApoE-KO idoso 8.496 ± 330 vs C57 idoso: 1.724 ± 566), sugerindo que a aterosclerose concomitante com o envelhecimento aumenta a produção de peróxido de hidrogênio nas células de sangue. Por outro lado, a análise estatística não revelou diferença nos níveis de peróxido de hidrogênio entre os animais C57 idosos e jovens (C57 idoso: 1.724 ± 566 vs C57 jovens: 1.207 ± 160), sugerindo que o envelhecimento, por si só, não altera a produção de peróxido de hidrogênio. Já os animais ApoE-KO idosos apresentaram maior nível de peróxido de hidrogênio no sangue quando comparado com os ApoE-KO jovens (ApoE-KO idoso: 8.496 ± 330 vs ApoE-KO jovens: 2.549 ± 55), que equivale ao aumento de 3 vezes na produção de peróxido nos animais ateroscleróticos idosos, revelando a importância da aterosclerose neste processo. Podemos observar na figura 30 e histogramas típicos da figura 31, logo abaixo.

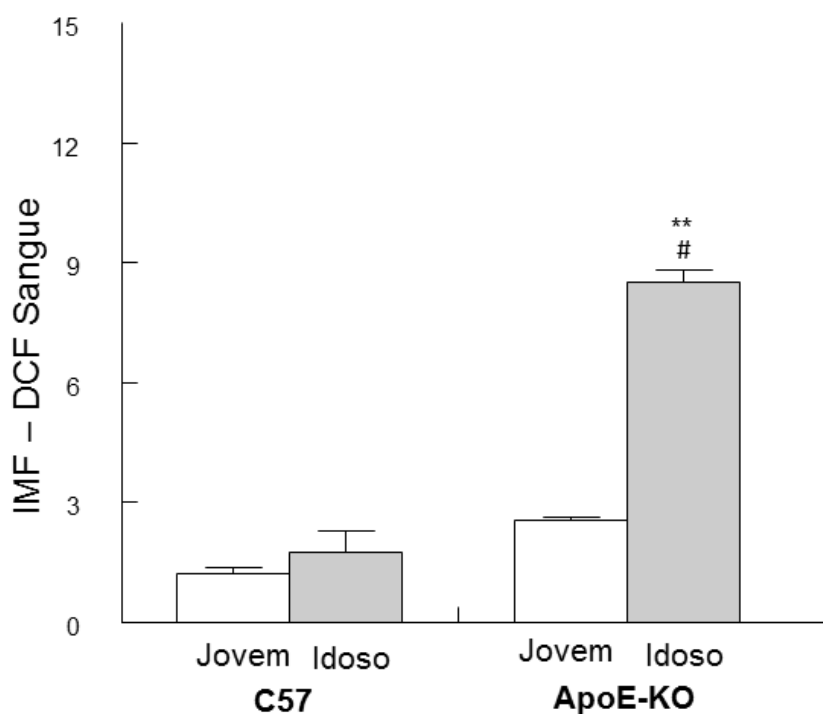


Figura 30: Intensidade média da fluorescência de DCF no sangue de animais C57 e ApoE-KO jovens e idosos. Barras brancas representam grupos C57 e ApoE-KO jovens (2 meses); barras cinza representam grupos C57 e ApoE-KO idosos (18 meses). Os valores indicam IMF \pm EPM (u.a x1000) de experimentos realizados em triplicata. ** p<0,01 vs ApoE-KO jovem; #p<0,05 vs mesma idade.

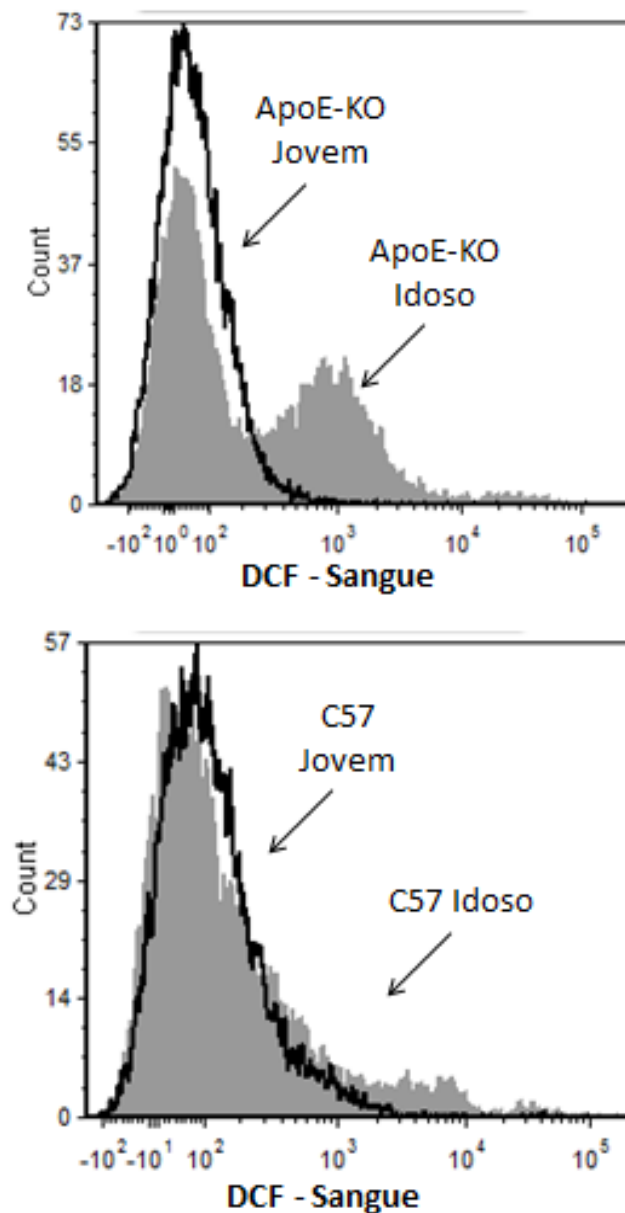


Figura 31: Histogramas típicos de intensidade de peróxido de hidrogênio, por citometria de fluxo, no sangue de animais idosos e jovens. Picos vazios (branco): ApoE-KO e C57 jovens, respectivamente. Picos cheios (cinza): ApoE-KO e C57 idosos, respectivamente. Os gráficos são típicos representativos de um animal.

4.6.3 Quantificação de Apoptose nas células Sanguíneas

A análise do teste de Anexina V-PI no sangue mostrou que o grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentaram maiores percentuais de células em apoptose quando comparados com os animais ateroscleróticos jovens (ApoE-KO idoso: $12,25 \pm 0,05$ vs ApoE-KO jovem: $0,96 \pm 0,13$), o que equivale ao aumento de 11 vezes no percentual de apoptose dos animais ateroscleróticos idosos. O grupo C57 idoso apresentou maior percentual de

apoptose quando comparado com o grupo C57 jovem (C57 idoso: $10,60 \pm 3,87$ vs C57 jovem: $1,3 \pm 0,55$), que significa aumento de 8 vezes no percentual de apoptose nos animais C57 idosos. Entretanto, não observamos diferença significativa quando comparamos os grupos ApoE-KO e C57 idosos (ApoE-KO idoso: $12,25 \pm 0,05$ vs C57 idoso: $10,60 \pm 3,87$) (figura 32), ou seja, a aterosclerose conjuntamente com o envelhecimento não foi capaz de gerar maior nível de apoptose nas células de sangue. Também não encontramos diferença significativa quando comparamos os grupos jovens C57 e ApoE-KO entre si (ApoE-KO jovem: $0,96 \pm 0,13$ vs C57 jovem: $1,3 \pm 0,55$). Os *dot plots* típicos estão representados pela figura 33.

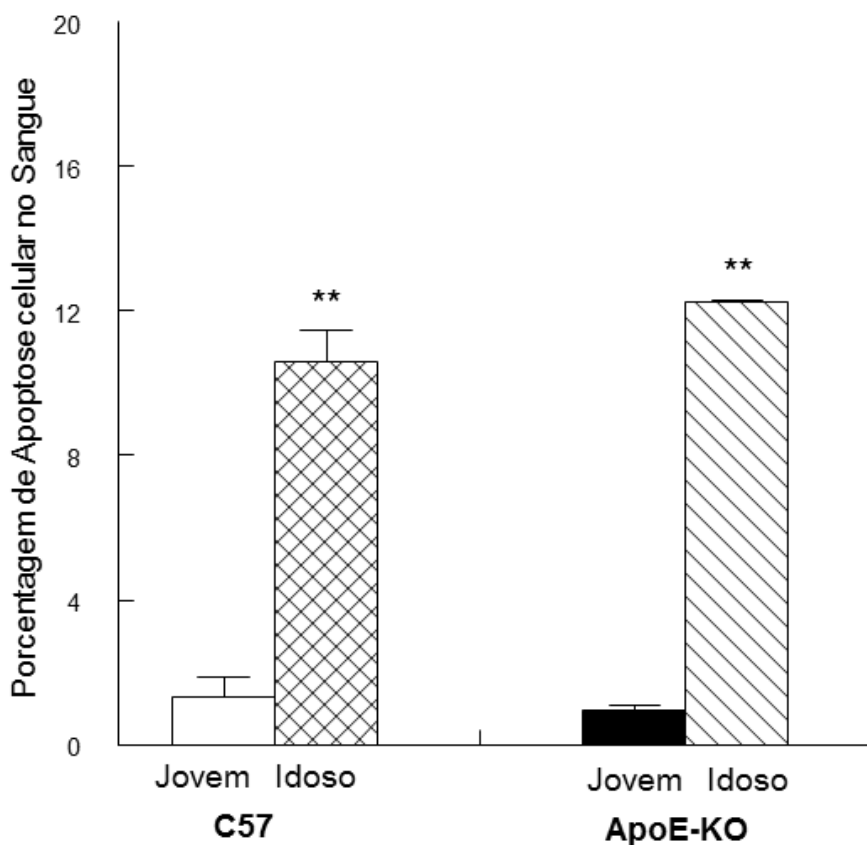


Figura 32: Gráfico de barras demonstrando a porcentagem de apoptose celular nas células sanguíneas de animais C57 e ApoE-KO. Sendo, barra branca grupo C57 jovem, barra quadriculada grupo C57 idoso, barra preta grupo ApoE-KO jovem e barra listrada grupo ApoE-KO idoso. Os valores indicam média±EPM. ** $p < 0,01$ vs. jovens (Anova 2 vias com *post hoc* Fisher).

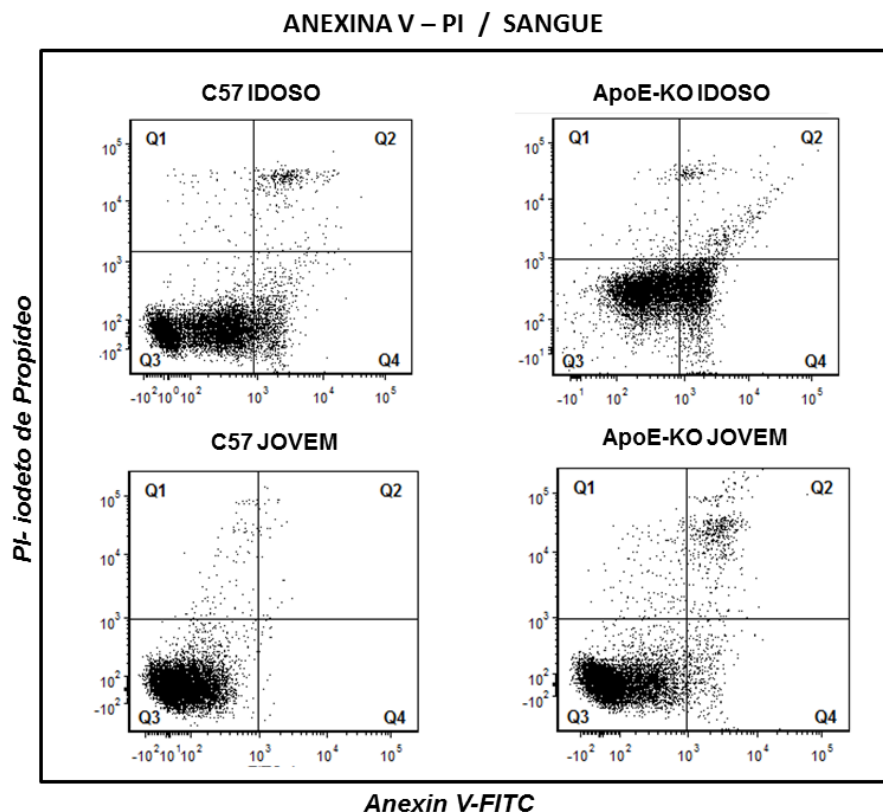


Figura 33: Dot plots típicos obtidos da análise de apoptose por teste de Anexina-V PI no sangue de animais C57 e ApoE-KO jovens e idosos. Sendo Q1: positiva apenas para PI – células com dano; Q2: Positiva para Anexina e PI -Apoptose; Q3: Negativa para anexina e PI - células viáveis; Q4: Positiva para anexina e negativa para PI - apoptose precoce;

4.7 QUANTIFICAÇÃO DA PLACA ATEROSCLERÓTICA, ANÁLISE DE ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE NAS CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA

4.7.1 Identificação das células endoteliais de aorta

As amostras de aorta foram incubadas com o anticorpo específico, anti-CD31-APC, para identificação de células endoteliais com objetivo exclusivo de confirmar a presença desta população celular nas amostras. Para isso, após isolamento, as células foram incubadas com o anticorpo ou com seu controle de isotipo IgG_{2a}-APC e, como pode ser observado na figura 34, os dados adquiridos por citometria de fluxo confirmaram a presença de células

endoteliais nas amostras isoladas de aorta torácica de camundongos. No histograma, o controle de isotipo está representado pela linha pontilhada e, como pode ser verificado na abscissa, não existem células emitindo fluorescência acima de 10^2 sendo este o limite de negatividade utilizado na técnica. A marcação de células endoteliais com CD31-APC está representada pela área azul, sendo possível verificar a presença de células emitindo fluorescência entre 10^3 e 10^5 confirmando a existência de células endoteliais na amostra.

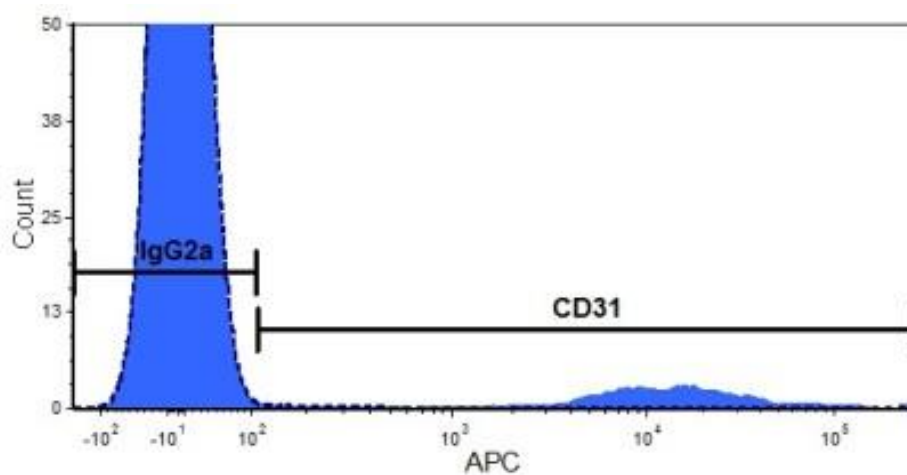


Figura 34: Identificação de células endoteliais. Histograma demonstrando a expressão do antígeno de superfície CD31 e do controle de isotipo IgG2_a. IgG2_a: fluorescência negativa (controle); CD31: fluorescência positiva (células endoteliais).

4.7.2 Intensidade média de fluorescência de DHE nas células endoteliais de aorta

O grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentaram maiores níveis de ânion superóxido (O_2^-) quando comparados com os animais ateroscleróticos jovens (ApoE-KO idoso: 7.973 ± 1.077 vs ApoE-KO jovem: 1.964 ± 169), que equivale ao aumento de 4 vezes na produção de ânions superóxido. O grupo C57 idoso também apresentou maior produção de ânions superóxido quando comparado com o grupo C57 jovem (C57 idoso: 4.919 ± 422 vs C57 jovem: 2.701 ± 239), que equivale ao aumento de aproximadamente o dobro. O grupo aterosclerótico idoso apresentou maior intensidade média de fluorescência para ânion superóxido quando comparado com o grupo C57

idoso (ApoE-KO idoso:7.973±1.1077 vs C57 idoso:4.919±422), o que sugere que a aterosclerose associada ao envelhecimento ocasiona o aumento da produção de ânion superóxido, conforme podemos observar na figura 35 e figura 36.

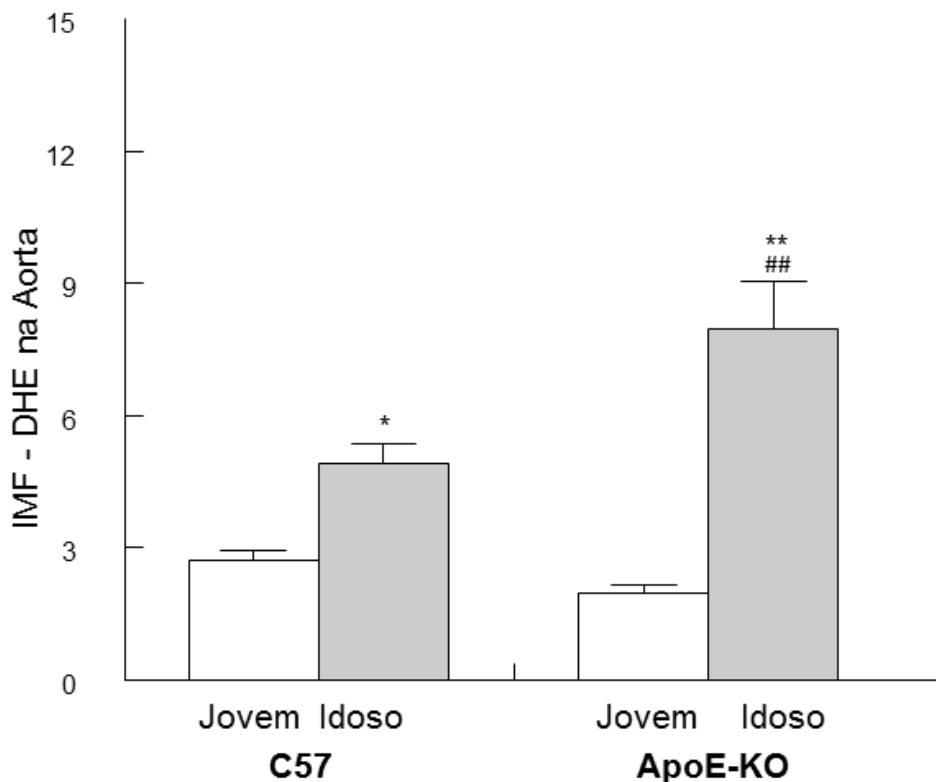


Figura 35: Intensidade média da fluorescência de DHE nas células endoteliais de aorta de animais jovens e idosos C57 e ApoE-KO. Barras brancas representam grupos C57 e ApoE-KO jovens (2 meses); barras cinza representam grupos C57 e ApoE-KO idosos (18 meses). Os valores indicam IMF±EPM (u.a x1000) de experimentos realizados em triplicata. ** p<0,01 vs ApoE-KO jovem; *p<0,05 vs C57 jovem e ##p<0,01 vs mesma idade.

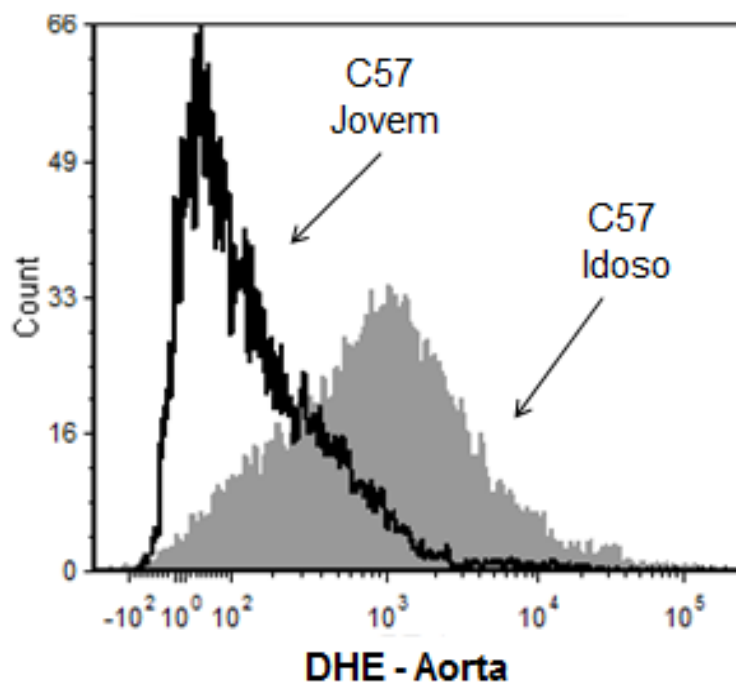
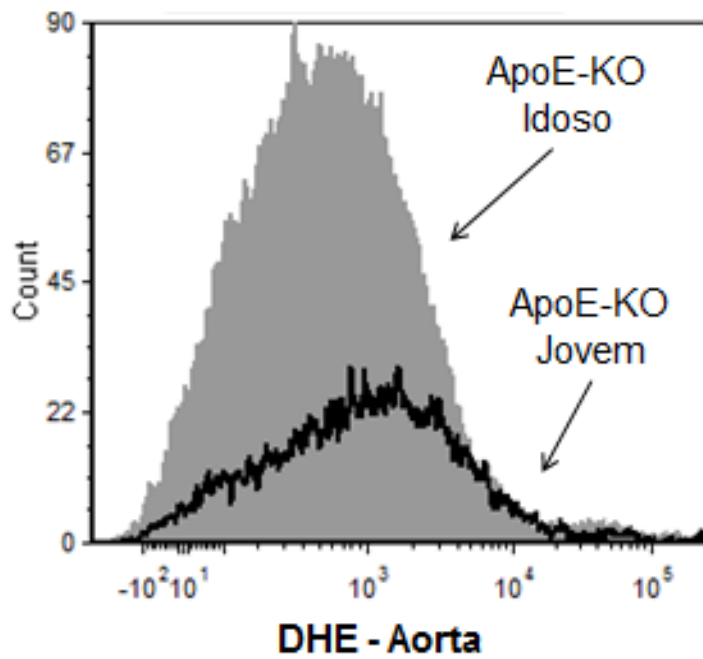


Figura 36: Histogramas típicos de intensidade média de fluorescência de DHE, por citometria de fluxo, nas células endoteliais de aorta de animais idosos e jovens. Picos vazios (branco): ApoE-KO e C57 jovens, respectivamente. Picos cheios (cinza): ApoE-KO e C57 idosos, respectivamente. Os gráficos são típicos representativos de um animal.

4.7.3 Análise da área de deposição lipídica *en face* nas aortas coradas com Oil red-O

Conforme os dados de nosso laboratório (Pereira et al., 2010) ilustrado pelas figuras 37 e 38 a análise *en face* da aorta mostrou grande área de deposição lipídica nos camundongos ApoE-KO idosos comparados com ApoE-KO jovens (36.3 ± 4.5 e 12.6 ± 1.5 mm², $p < 0.05$) e comparados com C57 idosos e jovens (4.5 ± 0.4 e 1.3 ± 0.2 mm²; $p < 0.05$).

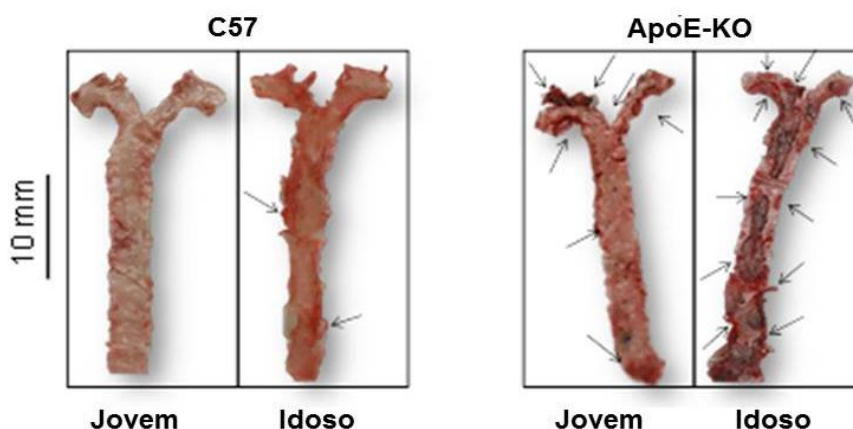


Figura 37: Representação de típicos de aorta *en face* coradas com Oil Red-O. As setas indicam concentração de área de deposição lipídica. Podem ser observados grande concentração de lipídeos na aorta de animal ApoE-KO idoso.

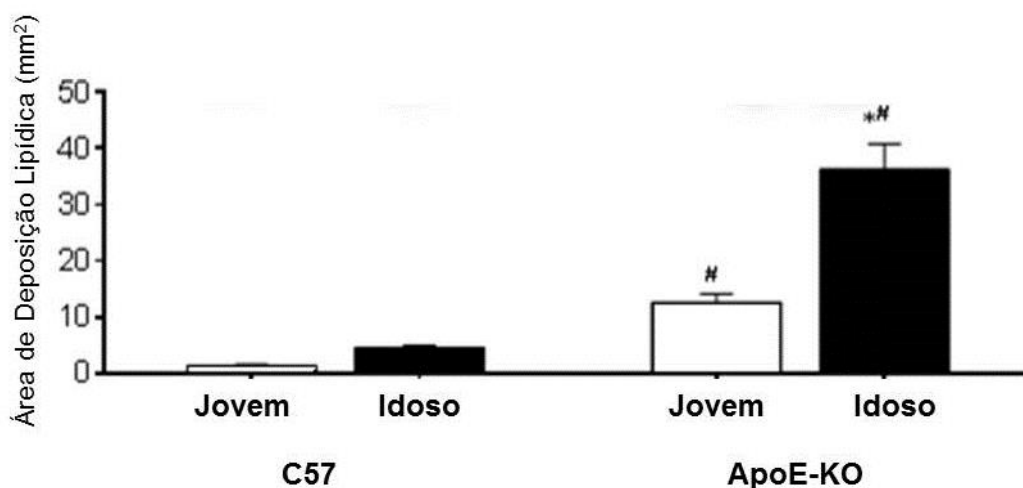


Figura 38: Área de deposição lipídica (mm²) das aortas *en face* coradas com Oil red-O. Barras pretas representam grupos C57 e ApoE-KO idosos e barras brancas grupos C57 e ApoE-KO jovens. Os valores estão representados em média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs ApoE-KO jovem; # $p < 0,05$ vs mesma idade.

4.7.4 Análise de cortes histológicos de Aortas coradas com DHE e Oil Red-O

As secções de aorta torácica foram coradas com Oil Red-O para detecção dos lipídeos presentes. Em uma análise qualitativa pode-se observar nas setas, a coloração vermelho-alaranjada conferida aos lipídeos presentes nas aortas dos animais ApoE-KO jovens e idosos (figura 39). As aortas dos animais C57 não apresentaram coloração vermelha, indicando ausência de lipídeos.

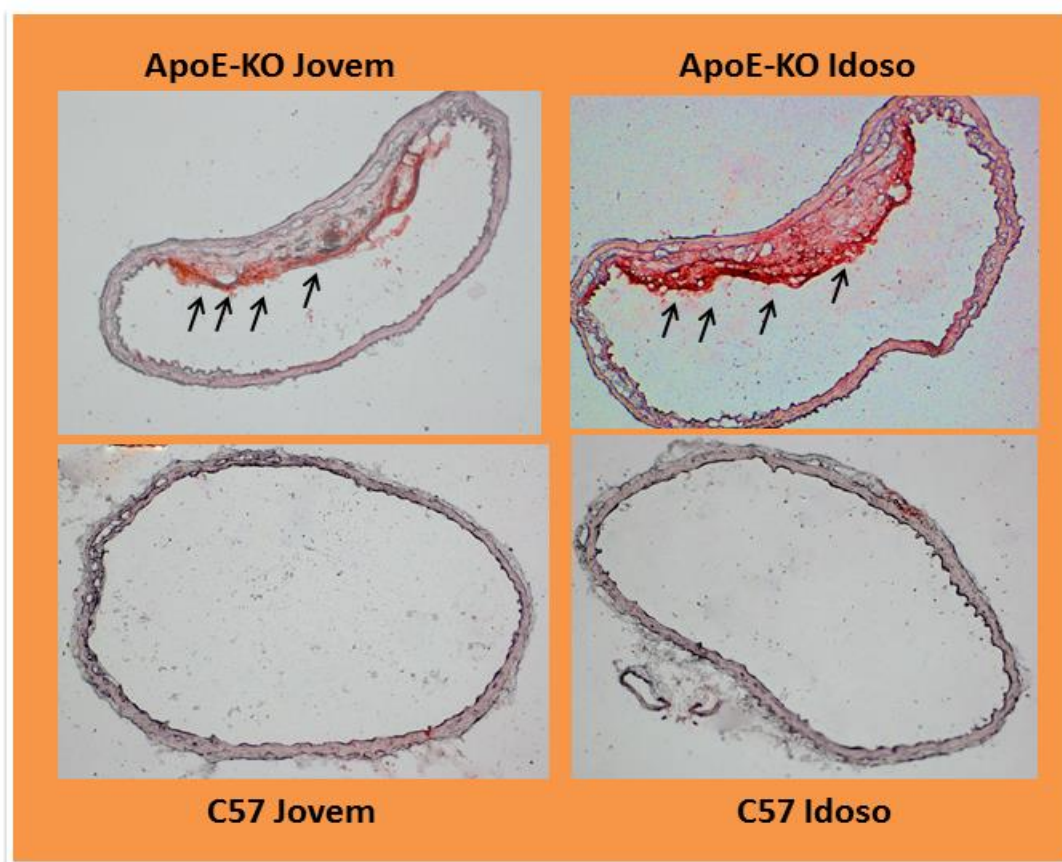


Figura 39: Cortes histológicos de aorta corados com Oil red (Aumento: 10X). Na parte superior da figura estão os animais ateroscleróticos jovens e idosos e na parte inferior os animais C57 jovens e idosos. As regiões vermelhas e as setas indicam presença de lipídeos nas aortas dos animais ApoE-KO de 2 meses e com maior intensidade nos animais ApoE-KO de 18 meses de idade.

A análise dos cortes histológicos de aorta torácica corados com DHE (figura 40 e 41) revelou um notável aumento da intensidade média de fluorescência nos cortes dos animais ApoE-KO idosos quando comparados com os ApoE-KO jovens (ApoE-KO idoso: 15.574 ± 634 vs ApoE-KO jovem: 5.363 ± 1.216). Os animais ApoE-KO idosos também apresentaram maior produção de ânion superóxido que os animais C57 idosos (ApoE-KO idoso: 15.574 ± 634 vs C57 idoso: 11.248 ± 957). Por sua vez, o grupo C57 idoso também apresentou maior produção de ânion superóxido quando comparado com o grupo C57 jovem (C57 idoso: 11.248 ± 957 vs C57 jovem: 2.136 ± 248).

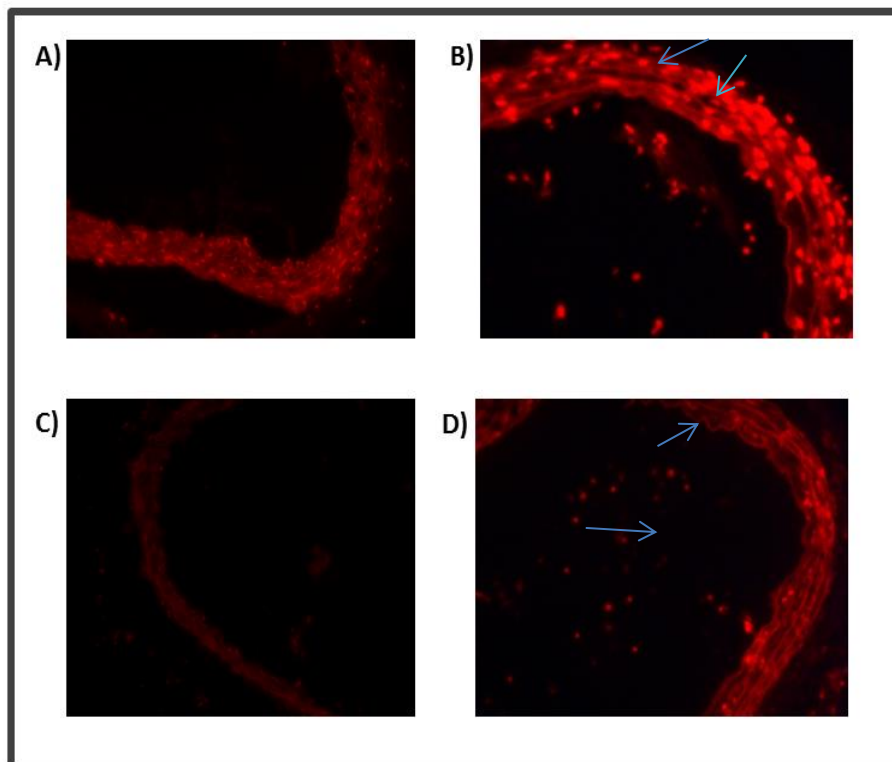


Figura 40: Cortes histológicos de aorta corados com DHE (Aumento:20x). A) Aorta de C57 Idoso. B) Aorta de ApoE-KO idoso. C) Aorta de C57 jovem. D) Aorta de ApoE-KO jovem. As setas mostram pontos vermelhos indicam produção de ânion superóxido. Pode-se observar a maior produção de ânion superóxido em animais ApoE-KO idosos, indicados pela figura B.

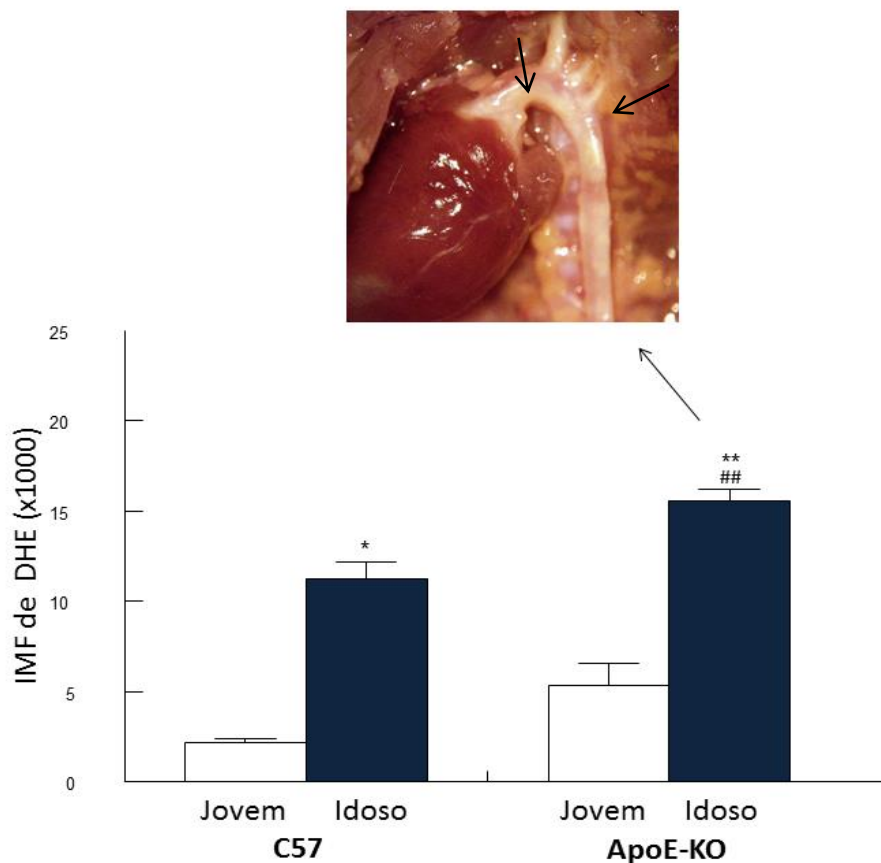


Figura 41: Intensidade Média de fluorescência de DHE em cortes histológicos de aorta dos animais jovens (barras brancas) e idosos (barras azuis) C57 e ApoE-KO. Acima coração e aorta de camundongo ApoE-KO idoso. Nota-se, indicado pelas setas, em tom amarelado a presença de placas ateroscleróticas. Os valores indicam $IMF \pm EPM$. * $p < 0,05$ vs. C57 jovem; ** $p < 0,01$ vs ApoE-KO jovem; ### $p < 0,01$ vs mesma idade (Anova 2 vias, *post hoc* Fisher).

4.7.5 Intensidade média de fluorescência de DCF-DA nas células endoteliais de aorta

Não foram encontradas diferenças significantes na produção de peróxido de hidrogênio nas aortas dos animais ApoE-KO idosos quando comparados com os animais ApoE-KO jovens (ApoE-KO jovem: 1.747 ± 293 vs ApoE-KO idoso: 1.961 ± 171). Também não encontramos diferença significativa entre o grupo ApoE-KO idoso e C57 idoso (ApoE-KO idoso: 1.961 ± 171 vs C57 idoso: 1.279 ± 297). Ainda, não encontramos diferença significativa entre o grupo C57 jovem e idoso (C57 jovem: 1.514 ± 127 vs C57 idoso: 1.279 ± 297). Os dados (figuras 42 e 43) sugerem que, nas células endoteliais de aorta, a produção de

peróxido de hidrogênio não é diferente nos animais ateroscleróticos e não se altera com o envelhecimento, tanto nos animais controle (C57) como nos ateroscleróticos (ApoE-KO). Quando comparado com os outros tecidos já analisados, percebemos que há um nível aparentemente baixo de produção de peróxido nas células endoteliais de aorta (~1.625).

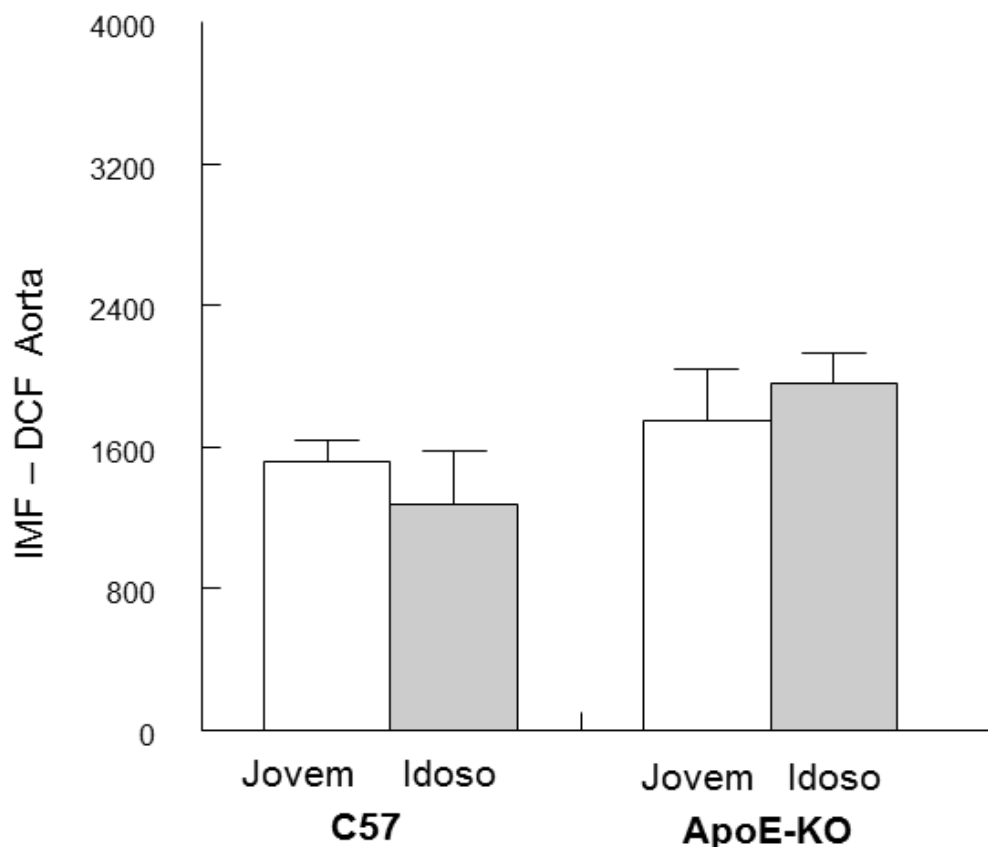


Figura 42: Intensidade média da fluorescência de DCF nas células endoteliais de aorta de animais jovens e idosos C57 e ApoE-KO. Barras brancas representam grupos C57 e ApoE-KO jovens (2 meses); barras cinza representam grupos C57 e ApoE-KO idosos (18 meses). Os valores indicam IMF±EPM de experimentos realizados em triplicata. Não foram encontradas diferenças estatísticas.

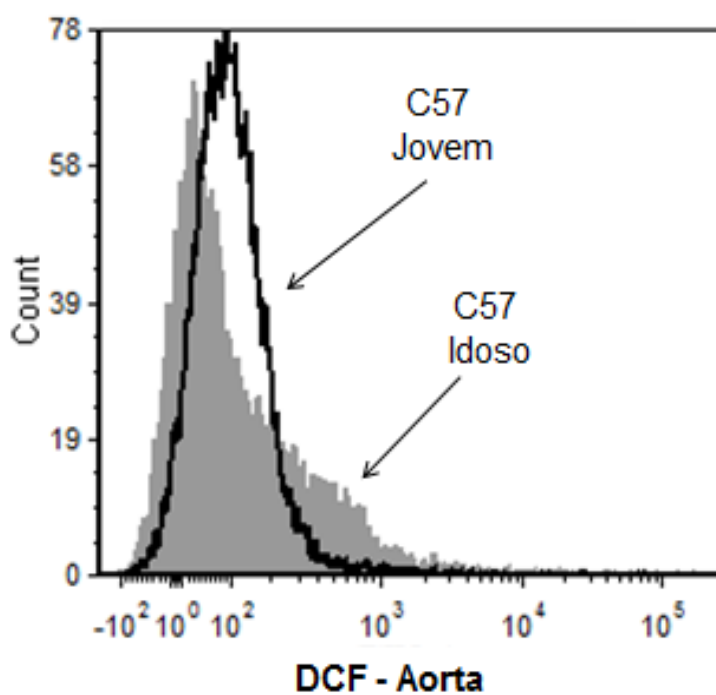
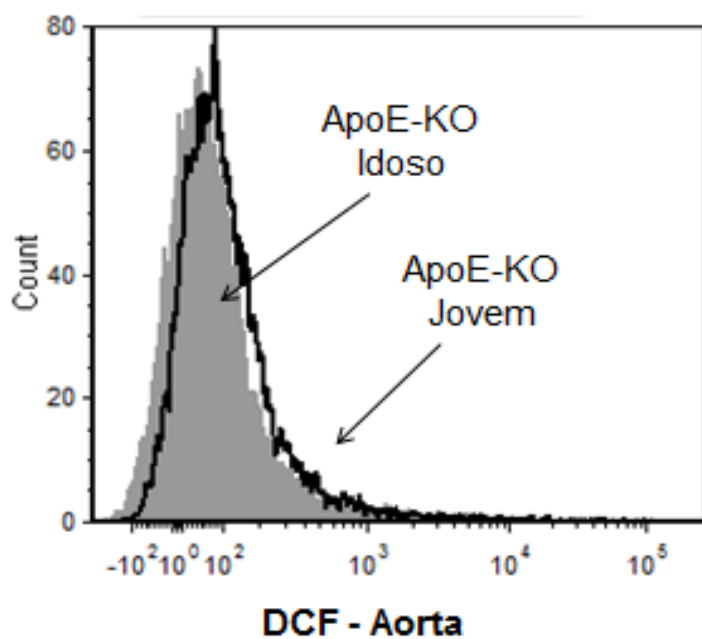


Figura 43: Histogramas típicos de intensidade de DCF por citometria de fluxo na aorta de animais idosos e jovens. Picos vazios (branco): ApoE-KO e C57 jovens, respectivamente. Picos cheios (cinza): ApoE-KO e C57 idosos, respectivamente. Os gráficos são típicos representativos de um animal.

4.7.6 Quantificação de apoptose nas células endoteliais de aorta

A análise do teste de Anexina V-PI mostrou que o grupo de animais ateroscleróticos de 18 meses de idade apresentaram maiores percentuais de células em apoptose quando comparados com os animais ateroscleróticos jovens (ApoE-KO idoso: $23,36 \pm 0,55$ vs ApoE-KO jovem: $1,15 \pm 0,12$), o que equivale ao aumento de 20 vezes. O grupo C57 idoso apresentou maior percentual de apoptose quando comparado com o grupo C57 jovem (C57 idoso: $23,25 \pm 7,71$ vs C57 jovem: $1,9 \pm 0,17$), que equivale ao aumento de 12 vezes. Entretanto, não houve diferença quando comparamos os grupos ApoE-KO e C57 idosos (ApoE-KO idoso: $23,36 \pm 0,55$ vs C57 idoso: $23,25 \pm 7,71$), e que pode ser observado nas figuras 44 e 45. Também não encontramos diferença significativa entre os grupos jovens ApoE-KO e C57 (ApoE-KO jovem: $1,15 \pm 0,12$ vs C57 jovem: $1,9 \pm 0,17$).

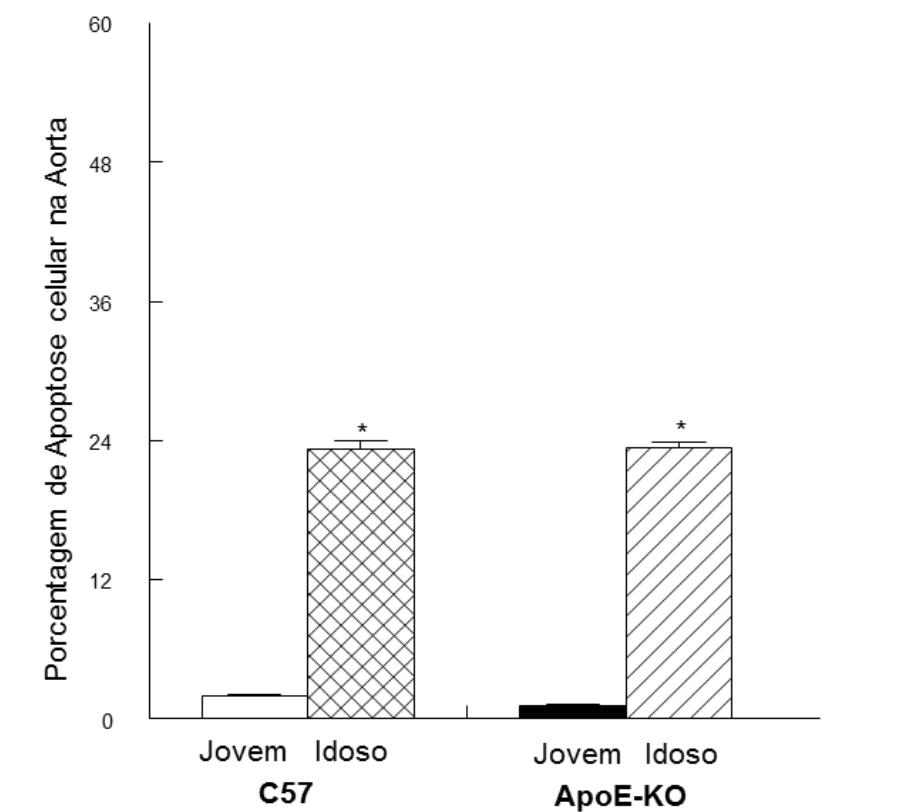


Figura 44: Porcentagem de apoptose celular na aorta de animais C57 e ApoE-KO jovens e idosos. Sendo, barra branca grupo C57 jovem, barra quadriculada grupo C57 idoso, barra preta grupo ApoE-KO jovem e barra listrada grupo ApoE-KO idoso. Os valores indicam percentuais realizados em triplicata. * $p < 0,05$ vs jovens (Anova 2 vias

com *post hoc* Fisher).

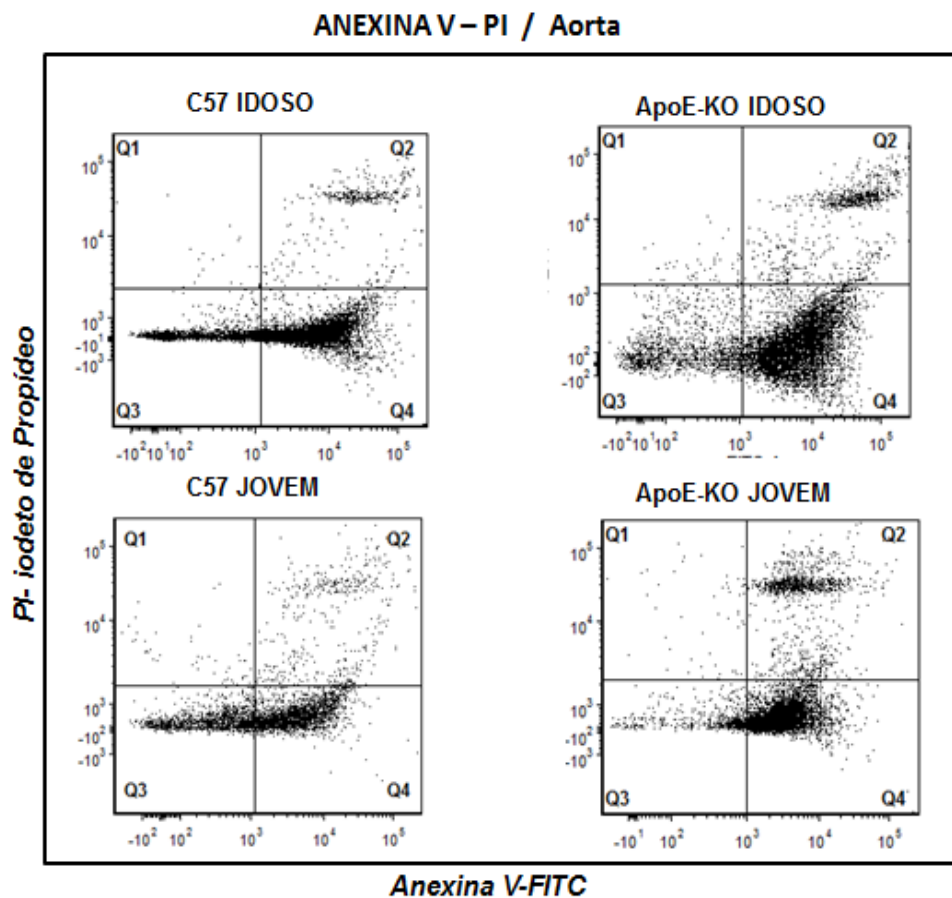


Figura 45: *Dot plots* típicos obtidos da análise de apoptose por teste de Anexina-V PI em aorta de animais C57 e ApoE-KO jovens e idosos. Sendo Q1: positiva apenas para PI – células com dano; Q2: Positiva para Anexina e PI -Apoptose; Q3: Negativa para anexina e PI - células viáveis; Q4: Positiva para anexina e negativa para PI - apoptose precoce;

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 CAMUNDONGOS APOE-KO TÊM NÍVEIS ELEVADOS DE COLESTEROL, ENTRETANTO, SEM ALTERAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLICOSE PLASMÁTICA

Camundongos selvagens são altamente resistentes ao desenvolvimento da aterosclerose (Breslow, 1996; Jawien *et al.*, 2004, Casós *et al.*, 2008), principalmente por transportarem maior parte do colesterol sanguíneo na fração HDL (mais de 85%) e possuírem baixos níveis de fração VLDL e LDL, caracterizando um perfil lipídico significativamente diferente do perfil humano, no qual a fração LDL é predominante sendo a principal carreadora de colesterol sanguíneo (65-85%) (Fazio & Linton, 2001; Breslow, 1996, Hofker *et al.*, 1998; Neuzil *et al.*, 1998). Apesar das diferenças, camundongos e humanos possuem, com poucas exceções, o mesmo conjunto de genes que controlam o metabolismo de lipoproteínas (Palinsk *et al.*, 1994; Hofker *et al.*, 1998; Jасcolka, 2010). Logo, surgiu a necessidade de desenvolver o camundongo ApoE-KO, um excelente modelo de estudo da aterosclerose por desenvolver lesões ateroscleróticas semelhante as lesões dos seres humanos.

Alguns estudos mostraram que animais C57, alimentados com dieta regular, possuem valores de colesterol total, triglicerídeos, VLDL+IDL, LDL e HDL de aproximadamente 60,65, 20, 10 e 50mg/dl respectivamente (Plump *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Stapleton *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011). Em nosso estudo, o nível de colesterol total encontrado nos camundongos C57 foi similar aos valores estimados. Isto é, conforme já citado anteriormente o camundongo controle possui nível de colesterol regular, mesmo quando sob dieta hipercalórica. Além disso, o nível de colesterol nos animais C57 não foi alterado com o envelhecimento, conforme o esperado uma vez que os camundongos, naturalmente, são muito resistentes a desenvolver aterosclerose, pois a maior parte de seu colesterol é composta pela fração HDL (Plump *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1992; Breslow, 1993; Bonthu *et al.*, 1997).

Segundo Pendse e colaboradores (2009), o camundongo C57 tem fração de colesterol total de aproximadamente 80mg/dl quando alimentado com dieta regular ou com dieta do tipo *Western* (hipercolesterolêmica). Isto se explica, segundo o autor, pelo elevado nível de HDL encontrado nestes animais que

naturalmente o camundongo possui. De forma semelhante, nossos animais C57 jovens e idosos apresentaram nível de colesterol total baixo, mostrando que nestes animais o envelhecimento não altera os níveis de colesterol total.

Por conseguinte, nossos resultados mostram que os grupos C57 jovem (2 meses) e idoso (18 meses) não apresentaram diferenças significativas estatisticamente (C57 jovens: 71,85mg/dl vs C57 idoso: 91,42mg/dl), logo a idade não altera o nível de colesterol total.

Entretanto, nos camundongos deficientes em apolipoproteína E observamos níveis elevados de colesterol, sugerindo que o acúmulo de remanescentes de quilomicrons e de VLDL no plasma constitui o estímulo aterogênico nestes animais (Zhang *et al.*, 1992; Breslow, 1996; Meir & Leitersdorf, 2004; Jасcolka, 2010). Os valores altos de colesterol encontrados nos grupos ApoE-KO jovens e idosos, em nosso estudo, estão de acordo com os valores de estudos clássicos como Nakashima (1994) e Reddick (1994), os primeiros a demonstrarem a histologia de placas ateroscleróticas e valores de referência de colesterol plasmático (Nakashima *et al.*, 1994; Reddick *et al.*, 1994), confirmando que o modelo utilizado (ApoE-KO) é capaz de desenvolver espontaneamente a aterosclerose, sendo possível observar a presença de células espumosas a partir dos 2 meses de idade.

Os valores de colesterol encontrados nos animais ApoE-KO jovens e idosos estão em consonância com estudo de Moghadasian e colaboradores (2001) que avaliou o perfil lipídico de animais ApoE-KO e C57. Na primeira análise, os animais ApoE-KO já apresentavam colesterol plasmático 6 vezes mais elevado que os animais controle e após 29 semanas este valor passou a ser 13 vezes maior. Em nossos resultados, também foi possível observar um aumento de 6 vezes na concentração de colesterol total nos animais ApoE-KO quando comparados com os animais C57.

A fim de afastar qualquer tipo de interferência com o desenvolvimento da aterosclerose ou com o envelhecimento e, conseqüentemente com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nos tecidos, avaliamos o nível de glicemia nos animais C57 e ApoE-KO. Esta análise revelou valores similares

entre os grupos, não havendo diferença estatística. Portanto, tanto o envelhecimento quanto a aterosclerose não foram capazes de alterar os valores de glicemia sanguínea.

Sabe-se que um dos fatores de risco para desenvolvimento da aterosclerose é o diabetes (Despres *et al.*, 1996; Stout, 1996). Estudos em seres humanos revelam a associação entre os níveis de glicose no sangue e a aterosclerose (Moghadasian *et al.*, 1997; Khaleeli *et al.*, 2001). Além disso, o índice de mortalidade de pacientes diabéticos que desenvolvem algum tipo de doença cardiovascular é alto (Soedamah & Stehouwer, 2005).

Os camundongos ApoE-KO não desenvolvem a hiperglicemia naturalmente, necessitam de um estímulo para que ocorra, como por exemplo, a dieta do tipo Western. Estes estudos mostraram que sob este tipo de dieta por 12 semanas, os camundongos ApoE-KO desenvolveram hiperglicemia (Moghadasian *et al.*, 2001; Su, *et al.*, 2006; Kawashima *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011). Outro tipo muito comum de indução de diabetes é o tratamento com estreptozotocina, substância tóxica para as células beta pancreáticas (Schuyler *et al.*, 2011).

Estudo desenvolvido por Cannizzo e colaboradores em 2012 mostrou que animais ApoE-KO que receberam 10% de frutose na água por 8 semanas apresentaram aumento significativo no nível de glicose sanguíneo quando comparados com os animais ApoE-KO que não receberam frutose na água de beber, mostrando que 8 semanas não foram capazes de modificar os valores de glicemia dos animais ApoE-KO controle. Entretanto, os autores não observaram diferença nos animais C57 entre os grupos que receberam frutose na água de beber e seus respectivos controles (Cannizzo *et al.*, 2012). Este estudo confirma a existência de uma correlação entre aterosclerose e diabetes, uma vez que quando submetidos à dieta de frutose, os animais ApoE-KO apresentam aumento da glicemia enquanto que nos animais C57 este método não é suficiente para alterar seu nível de glicose.

A partir do estudo de Cannizzo (2012) pode-se perceber que os níveis de glicose encontrados em nossos animais ApoE-KO e C57 jovens e idosos são semelhantes aos encontrados pelo autor e que, naturalmente, ou seja, com

dieta regular e mesmo com o envelhecimento, o nível de glicose nos animais ApoE-KO e C57 não se alteram e são semelhantes entre si, não havendo diferença entre os grupos.

5.2 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO E APOPTOSE DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA, SANGUE E AORTA DE CAMUNDONGOS ATEROSCLERÓTICOS E C57

Sabe-se que, fisiologicamente, as células exigem um equilíbrio entre as condições pró-oxidantes e antioxidantes do organismo. Logo, o rompimento do estado estacionário em favor da condição pró-oxidante é denominado de estresse oxidativo. Sabemos que este processo tem como consequência danos às biomoléculas como ao DNA, aos lipídios e às proteínas (Sies, 1993; Ribeiro, 2005).

As doenças cardiovasculares e o envelhecimento estão intimamente relacionados, uma vez que existe uma correlação positiva entre surgimento/agravamento de doenças cardiovasculares e envelhecimento. Além disso, tem sido demonstrada a associação de ambos com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, assunto que será bem abordado nesta discussão.

Neste estudo foi observado que os níveis de ânions superóxido, detectados pelo DHE, encontrados nas células mononucleares de medula óssea, sangue e aorta foram maiores em animais ApoE-KO idosos quando comparados com todos os outros grupos, inclusive quando comparado com o grupo C57 idoso. Isto sugere que a aterosclerose tem papel essencial e provoca aumento exacerbado na produção de ânions superóxido. Uma das consequências do aumento das espécies reativas de oxigênio é a apoptose celular, a qual se apresentou também elevada nos animais ApoE-KO.

O envelhecimento também provocou aumento da produção de ânions superóxido nas células de medula, sangue e aorta dos animais C57 idosos quando comparado com os C57 jovens, demonstrando que efetivamente leva

ao estresse oxidativo, pois observamos também a consequência deste panorama que foi a alta taxa de apoptose nas células de medula, aorta e sangue dos animais C57 idosos.

Com relação a produção de peróxido de hidrogênio, detectada pelo DCF-DA, observamos um aumento significativo nas células de medula óssea e no sangue de animais ApoE-KO idosos quando comparados com os outros grupos, incluindo o C57 idoso. O grupo C57 idoso também apresentou aumento da produção de peróxido de hidrogênio nas células de medula óssea quando comparado com seu controle jovem, mas não apresentou aumento nas células sanguíneas. Já nas células de aorta, os níveis de peróxido não sofreram alterações entre os grupos, porém aparentemente há nível baixo de peróxido de hidrogênio nos grupos, pois a intensidade média de fluorescência de peróxido de hidrogênio nos outros órgãos é mais alta.

Diversos estudos mostram que o estresse oxidativo é uma característica chave na aterogênese, pois as espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas em todas as fases da doença, da disfunção endotelial, formação e desenvolvimento da placa aterosclerótica até a ruptura da placa (Lee *et al.*, 2012).

Uma das razões que explica o envolvimento dos radicais livres no processo aterosclerótico, é a geração de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, que por vários mecanismos, danificam a parede vascular e causam lesões ateroscleróticas (Pecoits Filho *et al.*, 2002).

A importância do estresse oxidativo na doença aterosclerótica cardiovascular é destacada pela observação de que na presença de fatores de risco para a doença arterial coronariana há aumento do número de marcadores de estresse oxidativo (Antoniades *et al.*, 2003). Hidroperóxidos lipídicos do soro (LOOH) são gerados a partir de ácidos graxos poliinsaturados e representam principalmente produtos da peroxidação de ácidos graxos. Malondialdeído (MDA) também é um produto final de peroxidação lipídica. Ambos, LOOH e MDA, têm sido encontrados em número elevado na presença de fatores de risco cardiovascular (Sanderson *et al.*, 1995; Nacitarhan *et al.*, 1995; Lee *et al.*,

2012).

O endotélio também tem sido identificado como uma importante fonte de ERO nos vasos sanguíneos humanos (Guzik *et al.*, 2004) e a função endotelial está intimamente ligada a homeostase de formação de ERO no interior da parede vascular (Antonopoulos *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012).

Vários são os estudos que relacionam a presença da placa aterosclerótica com o aumento do número de espécies reativas de oxigênio. Miller, por exemplo, demonstrou, em seu estudo, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na parede vascular de animais ateroscleróticos, principalmente através da camada média arterial. Para isso utilizou células musculares lisas isoladas de aortas de coelhos. As espécies reativas foram detectadas com teste de lucigenina (Miller, 1998). Assim como Miller, também detectamos aumento da produção de ânion superóxido nas células endoteliais, sangue e medula óssea de animais ateroscleróticos. Corroborando os nossos resultados, em um estudo prospectivo, realizado por Anselmi e colaboradores (2006), foi demonstrado que pacientes com placas coronárias complexas têm níveis significativamente mais elevados de LDL-oxidada (Anselmi *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2012) logo há aumento da produção de ERO neste local.

Em consonância com nossos dados, Pernomian demonstrou, aumento da produção de ânions superóxido via citometria de fluxo, também através de DHE, em artérias carótidas de ratos hipertensos (Pernomian, 2012).

Mugge e colaboradores também demonstraram o aumento da produção de ânions superóxido, pela medida de quimioluminescência, em anéis de aorta obtidos de coelhos alimentados com colesterol (1%, durante 12 semanas) quando comparados com controles que receberam dieta normal (1994). Em estudo similar, realizado por Ohara, demonstrou-se que coelhos que recebiam dieta com 1% de colesterol por 4-6 semanas aumentavam a produção de ânion superóxido na aorta torácica (Ohara *et al.*, 1993).

D'Usciu, em 2001, observou, também através de cortes histológicos de aorta corados com DHE, aumento da produção de ânions superóxido nos

camundongos ApoE-KO tratados com dieta quando comparados com animais C57.

A aterosclerose, na maioria dos estudos, é associada ao aumento das espécies reativas de oxigênio devido ao desenvolvimento de um ambiente oxidativo causado pela ativação de macrófagos que, além de produzir espécies reativas de oxigênio, secretam citocinas e fatores de crescimento que contribuem para a progressão da placa aterosclerótica (Weber *et al.*, 2008; Nigro, 2010).

Semelhante ao observado em nosso estudo, Collins (2009) mostrou que camundongos LDL knockout com 21 meses apresentaram diminuição da expressão vascular de enzimas antioxidantes quando comparados com animais de 3 meses de idade (Collins, 2009), demonstrando que, além da aterosclerose, o envelhecimento também é responsável pelo aumento da produção de ROS. Diante disso, podemos sugerir que os animais ApoE-KO idosos, utilizados em nosso estudo, provavelmente apresentam diminuição da função antioxidante. Além disso, Mathews e colaboradores (2006) mostraram que o estresse oxidativo leva ao encurtamento de telômeros e, conseqüentemente, senescência prematura de células musculares lisas isoladas da placa aterosclerótica.

Portanto, estudos confirmam a existência de uma correlação positiva entre envelhecimento e produção de ERO, sendo que esta pode ser agravada por doenças cardiovasculares, como aterosclerose. Além disso, vários fatores de risco cardiovascular estão associados ao aumento do estresse oxidativo que, por sua vez leva à modificação funcional de várias proteínas, oxidação de LDL (lipoproteínas de baixa densidade), dano molecular (DNA, lipídios, proteínas), disfunção endotelial e a todas as condições que predisõem a aterogênese (Trescases *et al.*, 2010).

No presente estudo, verificamos aumento da produção de ERO, especificamente, ânions superóxido e peróxido de hidrogênio nas células de camundongos ateroscleróticos. Considerando que estas são as principais ERO produzidas pelo sistema cardiovascular, era de se esperar o aumento da produção destes tipos de ERO nos diferentes tipos celulares avaliados em

nosso estudo.

Tripathy, em 2003, demonstrou que a infusão de ácidos graxos livres em pacientes saudáveis aumenta a produção de ânions superóxido em células mononucleares isoladas de sangue. De forma semelhante, Zalba e colaboradores (2007) demonstraram aumento da atividade da enzima NADPH oxidase com conseqüente aumento da produção de ânion superóxido em monócitos isolados do sangue periférico de pacientes com aterosclerose.

Em nosso estudo observamos aumento da produção de peróxido de hidrogênio nas células sanguíneas de animais ApoE-KO idosos quando comparado com os demais grupos. Corroborando nossos dados, estudo realizado em camundongos LDL knockout mostrou aumento da produção de peróxido de hidrogênio em linfócitos isolados do baço destes animais (Paim *et al.*, 2008).

Vários sistemas enzimáticos podem levar a produção de ânion superóxido, participando assim do evento aterogênico, um desses sistemas é o da NADPH oxidase, que quando ativado, geralmente, em células fagocíticas (como macrófagos) origina o ânion superóxido que normalmente é utilizado como espécie reativa tóxica para microorganismos (Sies, 1985; Augusti, 2010). No sistema cardiovascular, a principal responsável pela produção de O_2^- nas células é a NADPH oxidase que catalisa sua produção pela redução do oxigênio, usando a NADPH como doadora de elétron (Gyllenhammar, 1987; Griending *et al.*, 1994; Mohazzab *et al.*, 1994; Pagano *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1998; Lassegue & Clempus, 2003).

Vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, demonstram o papel crítico da NADPH oxidase no estresse oxidativo no contexto da aterosclerose. De fato, entre os vários agonistas que podem ativar a enzima, contam-se vários fatores conhecidos por estar envolvidos na patogênese da doença, nomeadamente, a angiotensina II, trombina, PDGF, TNF- α , IL-1 e, mais especificamente para as células endoteliais, forças mecânicas incluindo o *shear stress* e fatores de crescimento do endotélio vascular (Brito, 2007; Rabelo *et al.*, 2009).

De acordo com Madamanchi e colaboradores (2005), células endoteliais,

musculares lisas e macrófagos são fontes de ERO que modificam fosfolipídeos e oxidam as LDL, além de estar envolvidas na sinalização vascular para migração e proliferação celular durante a formação da placa aterosclerótica.

Vários estudos demonstram que a disfunção endotelial relaciona-se com o aumento da atividade da NADPH oxidase (pelo aumento da expressão de suas subunidades catalíticas), já que lesões ateroscleróticas em artérias coronárias humanas mostram intensa expressão de *gp91phox* na região vulnerável da placa (Taniyama *et al.*, 2003; Stocker *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008; Rabelo *et al.*, 2010).

Wharnholtz e colaboradores (1999) também relataram aumento da atividade da enzima NADPH oxidase e consequente aumento de produção de ânion superóxido em artérias de coelhos tratados com dieta hipercolesterolêmica.

Sorescu e colaboradores (2002) detectaram um *upregulation* das subunidades *gp91phox* e *Nox4* de NADPH oxidase em macrófagos de coronárias de pacientes com aterosclerose e Barry-Lane e colaboradores (2001) observaram que camundongos knockout deficientes para subunidade *p47phox* exibiam menores níveis de ânion superóxido e que camundongos com deficiência de Apolipoproteína E e NADPH oxidase apresentavam menor desenvolvimento de aterosclerose que os animais ApoE-KO NADPH^{+/+} (Barry- Lane *et al.*, 2001).

Assim como Sheehan (2011) que também demonstrou que aortas de camundongos ApoE-KO apresentavam maior produção de ânion superóxido quando comparado com o grupo controle e que na ausência da subunidade *Nox1* da NADPH oxidase os níveis de ERO são diminuídos, confirmando a colaboração desta enzima neste modelo de aterosclerose.

Em outro estudo, aortas foram isoladas de camundongos ApoE-KO e C57 de 8 meses de idade, alimentados com dieta regular, para determinação da atividade da SOD. Não houve diferença entre os grupos C57 e ApoE-KO no que tange a atividade total da SOD, ou os níveis de Cu/Zn-SOD e Mn-SOD na aorta destes animais (Fukai *et al.*, 1998). Este estudo demonstra que a enzima SOD não gera nenhum mecanismo de compensação nos animais ApoE-KO,

logo como há aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio e não há atividade compensatória da enzima, ocorre maior acometimento das células por danos oxidativos, o que foi observado em nossos resultados, especialmente nas células mononucleares de medula óssea.

Como já se sabe, o excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta (Barreiros, 2006). A enzima superóxido dismutase (SOD), descoberta por Irwin Fridovich e Joe McCord (McCord & Fridovich, 1988) é a responsável por proteger contra a disfunção endotelial durante o envelhecimento (Lund *et al.*, 2009). O ideal seria a eliminação do excesso de ânion superóxido pela SOD que catalisa a transformação deste anion em peróxido de Hidrogênio (Halliwell & Gutteridge, 1990).

Há três grandes famílias de SOD que são classificadas segundo o metal que se ligam, são elas: Cobre e Zinco (SOD - Cu/Zn), presente nas células de eucariotos; Ferro e Manganês, presente nas células de procariotos e mitocôndrias; e uma Níquel, presente nos procariotos (Loon *et al.*, 2012). Há três tipos de SOD presentes em mamíferos, a SOD-1 localizada no citoplasma, SOD-2 na mitocôndria e SOD-3 extracelular. Além de gerar peróxido de hidrogênio, a SOD também reage com Óxido Nítrico (NO) formando peróxinitrito (Gardner *et al.*, 1995). Além disso, a SOD é a principal forma ativa na remoção do ânion superóxido em eventos pré-ateroscleróticos (Stralin *et al.*, 1995).

A enzima Glutathione peroxidase também tem importância na aterosclerose, sendo capaz de reduzir peróxido de hidrogênio em água e, com isso, diminuir os danos causados pelo peroxinitrito (Sies *et al.*, 1997; Loon *et al.*, 2012).

Outra enzima de grande importância é a catalase que é encontrada predominantemente em peroxissomos e converte peróxido de hidrogênio em água. Também pode ser encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Sua atividade é dependente de NADPH (Mayes, 1990; Scott *et al.*, 1991) e também tem participação na aterosclerose.

O peróxido de hidrogênio, portanto, pode ser removido pela enzima catalase, gerando oxigênio e água (Hunt *et al.*, 1998; Neuzil *et al.*, 1998). As enzimas glutathiona peroxidase e redutase também podem participar deste processo (Augusti, 2010). Vários estudos demonstram que, durante a aterosclerose, o peróxido de hidrogênio estimula diretamente a indução de apoptose de células musculares lisas e o ânion superóxido, por sua vez, inativa o óxido nítrico (Papaharalambus & Griendling, 2007).

Estudos com camundongos ApoE-KO demonstraram a ativação de genes de enzimas antioxidantes durante o desenvolvimento das estrias gordurosas no início da formação da placa aterosclerótica (Hoen *et al.*, 2003). Collins percebeu que o desenvolvimento da placa aterosclerótica era proporcional ao aumento de espécies reativas de oxigênio e consequente diminuição de Glutathiona peroxidase, SOD e catalase (Collins *et al.*, 2009). A presença da enzima catalase foi relacionada ao retardo do desenvolvimento da placa aterosclerótica (Yang *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2004; Kirkman *et al.*, 2007).

O estudo de Mogadadashian e colaboradores sobre a capacidade antioxidante encontrada em diferentes órgãos do camundongo ApoE-KO é de grande importância e ajuda a entender as respostas tecido-específicas. Seus resultados indicam uma variação significativa dos componentes endógenos antioxidantes, por exemplo, o rim apresentou altos níveis de GPx, Glutathiona redutase e catalase, enquanto que no plasma sanguíneo os níveis foram baixíssimos, com exceção para catalase que não foi detectada no plasma. Também foi detectada alta atividade da SOD no coração, rim e pulmão, enquanto que no plasma sanguíneo a atividade foi baixa. Interessante ressaltar, que em seu experimento, não encontraram diferenças entre C57 e ApoE-KO.

Em outro estudo, foi encontrada baixa atividade das enzimas SOD e catalase em aortas de camundongos ApoE-KO de 30 semanas de idade quando comparado com os animais C57 (Yaghoubi *et al.*, 2000; Villeneuve *et al.*, 2003).

Logo, nossos resultados que indicam aumento da produção de ânion superóxido em células de medula óssea, sangue e células endoteliais de aorta

podem sugerir queda da atividade da SOD nestes órgãos. Por outro lado, com relação ao peróxido de hidrogênio podemos dizer que a atividade da catalase é diferenciada, pois encontra-se prejudicada nas células sanguíneas dos animais ApoE-KO idosos, pois ocorreu aumento da produção de peróxido de hidrogênio nestes animais, enquanto que nos animais C57 o nível de peróxido se manteve baixo mesmo nos idosos, sugerindo um *upregulation* da enzima catalase no sangue destes animais. Já nas células de medula óssea, ocorreu aumento da produção de peróxido tanto em C57 quanto em ApoE-KO idosos, o que sugere um *downregulation* da catalase na medula óssea. Apesar de não termos encontrado diferença no nível de peróxido de hidrogênio nas células endoteliais dos animais, aparentemente há nível baixo em todos os grupos, o que sugere um sistema antioxidante atuante na aorta destes animais.

Um estudo com pacientes hipercolesterolêmicos jovens demonstrou a capacidade de redução de estresse oxidativo através de vitamina E combinada com óleo de peixe e niacina (Accinni *et al.*, 2006). Entretanto, outros estudos têm demonstrado resultados negativos, no que tange a utilização de antioxidantes como efeito protetor contra a produção de ERO. O grande problema em utilizar terapia com antioxidantes, como a vitamina E, está em sua insolubilidade em água, o que acaba prejudicando o transporte intracelular e, conseqüentemente, não degradando as espécies reativas de oxigênio. A solução para estes casos foi a utilização de Vitamina C, pois esta é solúvel em água e logo, atingiria o compartimento intracelular. Entretanto, a Vitamina C tem um limiar de absorção de apenas 200mg e o aumento desta acaba produzindo danos oxidativos ao DNA dos pacientes (Podmore *et al.*, 1998; Hodis *et al.*, 2002; McGregor *et al.*, 2006).

Quando o tratamento com antioxidantes é utilizado em pacientes com doenças cardiovasculares já bem estabelecidas, há claramente insuficiência na proteção contra ERO (Vivekananthan *et al.*, 2003). Isto também foi demonstrado por Averill e colaboradores que trataram camundongos ApoE-KO idosos (7 meses) com dieta antioxidante, que continha uma mistura de vitaminas C e E e não perceberam efeito algum na redução do tamanho da placa aterosclerótica ou diminuição de espécies reativas de oxigênio (Averill *et al.*, 2009). Argumento a *fortiori*, se nossos animais ApoE-KO idosos com 18 meses de idade fossem

tratados com essa dieta antioxidante, muito provavelmente seria insuficiente para impedir os eventos oxidativos.

Ainda, no que tange as enzimas antioxidantes, há um outro estudo, realizado em camundongos ApoE-KO que mostrou maior desenvolvimento da placa aterosclerótica quando estes animais eram deficientes para enzima antioxidante glutatona peroxidase, além disso foi observado maior produção de espécies reativas de oxigênio no local da placa (Torzewski *et al.*, 2007).

Em estudo realizado por Peled Kamar e colaboradores, em 1995, camundongos Knockout para SOD (CuZn) mostraram diminuição do número de células hematopoiéticas na medula óssea. Neste estudo foi demonstrado que estes animais apresentaram aumento da peroxidação lipídica o que acarretou em danos oxidativos nas células de medula óssea e, conseqüentemente apoptose celular (Peled Kamar *et al.*, 1995).

Ademais, o estresse oxidativo/nitrosativo pode estar presente em um órgão e ausente em vários; e, mesmo na sua presença, pode não haver alterações suficientes para induzir o envelhecimento celular (Pérez *et al.*, 2009). Além disso, vários estudos demonstram que a produção de espécies reativas de oxigênio aumenta com o envelhecimento (Wang & Bennett, 2012) e que associado a isto estão as evidências de que, com a idade declina também o sistema antioxidante capaz de reverter este quadro.

Logo, podemos relacionar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, precisamente ânions superóxido e peróxido de hidrogênio, nas células mononucleares de medula óssea encontrado nos animais controle (C57) idosos de 18 meses de idade com este fenômeno observado durante o envelhecimento. Além disso, também observamos que as células endoteliais dos animais C57 idosos apresentaram maior produção de ânion superóxido que os animais jovens o que também pode estar associado ao declínio do sistema antioxidante devido ao envelhecimento.

Em nosso estudo, avaliamos o potencial oxidante nas células sanguíneas dos animais ateroscleróticos e controle. Sabe-se que os linfócitos são importantes

células imunológicas, presentes em grande quantidade no sangue. Estas células do sistema imune usam as ERO para a realização de suas funções normais, mas uma quantidade excessiva de ERO pode atacar componentes celulares que levam a lesão. Os níveis de antioxidantes em células imunes desempenham um papel central na proteção contra o estresse oxidativo e, portanto, preservação de sua função adequada (Gautam, 2010).

O sangue humano é, portanto, uma excelente fonte de marcadores *in vivo* de estresse oxidativo, uma vez que nele são transportados e redistribuídos antioxidantes e endobióticos modificados por ação das espécies reativas de oxigênio. O sistema antioxidante sanguíneo é classificado em enzimático, representado pelas enzimas antioxidantes, e não-enzimático, formado por vitaminas e substâncias, como a glutathione. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes: a superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e O_2 , a catalase que atua na decomposição de H_2O_2 a O_2 e H_2O e a glutathione peroxidase, que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator. e o sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathione, principal composto antioxidante intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e β -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina (transporte do cobre e oxidação do ferro para ser captado pela transferrina) (Halliwell *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2007).

Logo, no sangue circulam importantes antioxidantes, a exemplo das vitaminas C, E, β -caroteno etc., bem como biomarcadores do dano causado por espécies reativas de oxigênio e outros, como malondialdeído (MDA), isoprostanos lipoperóxidos e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas celulares (Vasconcelos *et al.*, 2007).

Sabe-se que em linfócitos, as ERO são geradas como subprodutos de processos metabólicos normais que ocorrem na mitocôndria, nos peroxissomos (β -oxidação de ácidos graxos) e em sistemas enzimáticos do citosol (lipooxygenase, NADPH oxidases, citocromo P450) (Sauer *et al.*, 2001).

Em nosso estudo, a análise das células do sangue mostrou que a produção de ânions superóxido apresentou aumento significativo com o envelhecimento nos animais C57, por outro lado, a produção de peróxido não foi alterada. Entretanto, quando os animais ApoE-KO idosos foram comparados com os animais C57 idosos, observamos aumento significativo da produção de ânions superóxido e de peróxido de hidrogênio no sangue, sugerindo que a formação da placa aterosclerótica associada ao envelhecimento está diretamente relacionada a produção de espécies reativas de oxigênio. Isto sugere um sistema antioxidante eficaz contra algumas espécies reativas de oxigênio e ineficaz contra outras.

A baixa atividade de glutathione peroxidase em células sanguíneas foi correlacionada com aumento da incidência de doenças cardiovasculares (Espinola-Klein *et al.*, 2007).

Gautam realizou, em 2010, um estudo sobre o efeito do envelhecimento em linfócitos coletados de sangue de pacientes saudáveis de 11-20, 21-30, 31-40, 41-50 e 51-60 anos de idade. Para tanto, observou o efeito aumentado da peroxidação lipídica e proteica no envelhecimento. A atividade das glutathione peroxidase (GPx), redutase (GR) e transferase (GST), e da SOD apresentaram declínio altamente significativo nos grupos de 51-60 anos de idade comparados com o grupo de 11-30 anos de idade (Gautam, 2010), revelando o papel do envelhecimento neste processo.

A teoria do envelhecimento pelo estresse oxidativo prevê que animais como camundongos C57 (*mus musculus*) utilizam uma ou mais estratégias para atrasar/limitar danos celulares pelo estresse oxidativo: i) produção diminuída de espécies reativas de oxigênio no início da vida, assim leva tempo até alcançar patamar crítico de produção. ii) tolerância aumentada contra aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (incluindo defesa antioxidante e mecanismos de reparo). iii) taxa mais lenta de aumento da geração de ERO relacionadas com a idade (aumentando o tempo necessário para atingir um limiar crítico) (Csiszar, 2007). Porém, várias alterações podem ser observadas durante o envelhecimento, que incluem, uma reduzida capacidade para utilizar o oxigênio, juntamente com capacidade cardiocirculatória prejudicada e

adaptação respiratória, deterioração do sistema nervoso central (redução na forma, largura, e taxa de condução do potencial evocado), e degeneração da massa muscular caracterizada por uma redução diâmetro das fibras musculares (Pansarasa *et al.*, 1999; Doria *et al.*, 2012).

Por fim, deve-se ressaltar que estímulos patogênicos como o estresse oxidativo ativam a via de sinalização do fator nuclear kappa beta (NFkB) que, por sua vez, induz a ativação de genes associados ao envelhecimento celular (Ferrari *et al.*, 2009; Salminen *et al.*, 2009; Gutteridge *et al.*, 2010; Silva & Ferrari, 2011).

Vários estudos têm relatado diminuição da expressão e atividade de genes que codificam enzimas antioxidantes em animais idosos (Collins, 2009). Isto fica claro quando observamos o impacto do envelhecimento sobre a produção de espécies reativas de oxigênio, especificamente o ânion superóxido, nas células de aorta, sangue e mononucleares de medula óssea dos animais C57 idosos quando comparados com os animais C57 jovens.

Em estudo realizado por Collins, a análise de tecidos retirados de animais idosos revelou alto índice de espécies reativas de oxigênio responsável por disfunção mitocondrial, danos às células vasculares e oxidação de lipídios (Collins, 2009). Outros tecidos também já foram avaliados em outros estudos, quanto ao impacto do envelhecimento na produção de espécies reativas de oxigênio. Harper e colaboradores (1998) demonstraram que a produção de O_2^- é significativamente mais elevada em hepatócitos isolados cultivados de ratos idosos com 30 meses em comparação com os dos ratos de 3 meses de idade (Massudi *et al.*, 2012).

Além do aumento do estresse oxidativo e de lesões decorrentes deste (oxidação do DNA, peroxidação lipídica e de proteínas), diversos estudos reportaram redução dos sistemas celulares de defesa antioxidante (glutathiona, glutathiona-peroxidase e catalase) em tecidos e fluidos biológicos de animais senescentes, em comparação com jovens (Akila *et al.*, 2007; Sionová, 2007). Um estudo observou aumento da formação de lipoperóxidos, diminuição da atividade antioxidante do plasma associada à idade e redução da atividade da

enzima Glutathione peroxidase dos eritrócitos, sem alteração da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) no decorrer do processo de envelhecimento (Mendoza, 2007).

Em nosso estudo, observamos que há aumento da produção de superóxido durante o envelhecimento do animal, o que sugere uma atividade prejudicada da SOD no sangue dos animais C57 idosos. Quanto à produção de peróxido de hidrogênio, pode-se sugerir que há uma variação da atividade da enzima catalase conforme a linhagem ApoE-KO e C57, pois quando avaliamos, por exemplo, a produção de peróxido de hidrogênio no sangue de animais ApoE-KO observamos sistema antioxidante fraco enquanto que na análise de animais C57 o que parece é que a atividade da enzima foi suficiente para compensar a produção de peróxido, pois não há diferença entre animais C57 jovens e idosos.

Cand e Verdeti (1989) demonstraram que a atividade das enzimas antioxidantes não respondem de forma similar durante o envelhecimento, além disso, a atividade das enzimas variava dependendo do tecido alvo. Em seu estudo, utilizaram ratos Wistar de 4 meses e 24 meses, sendo este considerado idoso e investigaram a atividade das enzimas Gpx, SOD e catalase nos órgãos: fígado, rim e coração. Observaram que a atividade da SOD e Gpx diminuía significativamente com envelhecimento no fígado e rim. Entretanto, encontram atividade da catalase aumentada no músculo cardíaco mas diminuída nos outros órgãos. Os resultados demonstraram que o sistema antioxidante tem respostas diversas frente ao envelhecimento e que há variação conforme o tecido (Cand & Verdeti, 1989).

Desta forma, diante dos sistemas antioxidantes vs pro-oxidantes, faz-se necessário um balanceamento para que não ocorra produção exagerada de espécies reativas de oxigênio, o que muitas vezes não é possível quando há uma patologia associada.

Os dados de Cand e Verdeti auxiliam no entendimento de nossos resultados, uma vez que como utilizamos tecidos diferentes, cada um tem um tipo de resposta frente ao envelhecimento e doença, pois o sistema antioxidante é

variável nestes. Conforme observamos em nossos resultados, não encontramos diferença entre os grupos na produção de peróxido de hidrogênio nas células endoteliais de aorta, o que pode ser explicado possivelmente por atividade aumentada da enzima catalase, usando uma analogia com o estudo de Cand e Verdeti. O mesmo encontramos nas células sanguíneas do grupo C57, no qual não há diferença entre jovens e idosos no que tange a produção de peróxido de hidrogênio, sugerindo também um possível aumento da atividade da enzima catalase.

Por outro lado, os resultados encontrados sobre o estresse oxidativo nas células mononucleares de medula óssea foram bem reveladores e de grande importância para a literatura científica, pois é o primeiro estudo a demonstrar o impacto da aterosclerose e do envelhecimento sobre as células de medula óssea. É nela que são produzidas as células do sangue: Eritrócitos, Leucócitos e plaquetas. Estes componentes do sangue são renovados continuamente e a medula óssea é quem se encarrega desta renovação. No homem adulto sadio são produzidos cerca de 2,5 bilhões de eritrócitos, 2,5 bilhões de plaquetas e 1,0 bilhão de granulócitos por kg de peso corporal (Junqueira & Carneiro, 2004). Além disso, a medula óssea é fonte de células tronco, que atuam no reparo de danos vasculares, como, por exemplo, durante a formação da placa aterosclerótica.

Estudos recentes demonstraram a migração de células tronco para local de lesão na placa aterosclerótica e consequente diferenciação em células musculares lisas (Shin *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012).

Lipídios sistêmicos derivados da dieta podem ser liberados na medula óssea através de quilomicrons. A hiperlipidemia pode influenciar negativamente as células tronco tanto no pool de células da medula óssea quanto no pool da circulação (Hussain *et al.*, 1989). Experimentos realizados em coelhos revelaram que além do fígado, a medula óssea também atua no *clearance* de quilomicrons. Também há evidências de que ocorre a captação de LDL na medula óssea (Wiklund *et al.*, 1987; Hussain *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1988).

Outro dado de grande importância para entendimento dos resultados é o

comportamento das células tronco em seu nicho, a medula óssea. Algumas populações de células na medula óssea, como por exemplo, as células hematopoéticas mantem-se em um estado de quiescência contribuindo dessa forma para longevidade e função das mesmas e provavelmente reduzindo o estresse oxidativo proveniente da respiração celular (Eliasson & Jonsson, 2010).

A medula óssea, é, portanto, a principal fonte de células tronco multipotentes do organismo. Alguns estudos demonstraram a importância do baixo nível de oxigênio encontrado na medula óssea. Este ambiente de hipóxia é responsável pela manutenção do estado quiescente das células tronco. (Ceradini *et al.*, 2004; Suda *et al.*, 2005; Wilson & Trump, 2006; Yin & Li, 2006; Jang & Sharkis, 2007; Parmar *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2010).

Portanto, as células tronco derivadas da medula óssea são reguladas pelo microambiente da medula, que envia sinais para que se renovem, diferenciem, migrem conforme a necessidade dos tecidos. As espécies reativas de oxigênio, especialmente o peróxido de hidrogênio, são importantes para regulação das funções das células tronco em resposta a vários estímulos fisiológicos. O nível baixo de peróxido de hidrogênio na medula óssea é importante para manutenção do estado de quiescência das células tronco, em sentido contrário, níveis altos de peróxido de hidrogênio contribuem para promover migração, diferenciação e proliferação das células tronco hematopoiéticas e progenitoras. Em resposta à injúria vascular as espécies reativas de oxigênio, derivadas da NADPH oxidase, encontram-se aumentadas na medula óssea o que acarreta um ambiente oxidativo. Este estado leva a migração das células tronco para o local de reparo. Entretanto, diante do envelhecimento e condições patológicas como aterosclerose, hipertensão e diabetes há aumento exagerado da produção de espécies reativas de oxigênio o que acarreta em um nicho de medula óssea altamente oxidante e inflamatório, logo induzindo à apoptose e ao dano celular (Tothova *et al.*, 2007; Jang *et al.*, 2007; Naka *et al.*, 2008; Urao & Fukai, 2012; Sardina *et al.*, 2012;). Assim, o nicho da medula óssea é pobre em oxigênio, mas a situação muda quando a NADPH oxidase é ativada e as células tronco são obrigadas a proliferar e migrar para áreas de lesão (Heissig *et al.*, 2002; Koop *et al.*, 2005; Suda *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).

A NADPH oxidase, principal fonte de ERO, é formada por várias subunidades, dentre elas as gp91^{phox} (NOX2) e p22^{phox}. Estudos com isquemia de membro demonstraram que a expressão de NOX-2 se encontra aumentada nas células mononucleares de medula óssea (Urao *et al.*, 2008; Urao *et al.*, 2012). Logo, aumentando também a diferenciação e migração de células tronco da medula óssea para o sangue. Durante o processo de diferenciação celular, ocorre um *downregulation* de genes antioxidantes enquanto que as NOX são ativadas, portanto ocorre aumento do número de espécies reativas de oxigênio na medula óssea que estimula a diferenciação das células tronco (Saretzki *et al.*, 2004, Buggisch *et al.*, 2007).

Diante disso, é importante frisar o papel das células tronco derivadas da medula óssea para regeneração de danos vasculares. Em contrapartida, como os estudos indicam, na presença de uma patologia como a aterosclerose, os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio estão extremamente alterados, e, certamente há o comprometimento das células tronco. Como observamos em nosso estudo, as células mononucleares de medula óssea apresentaram alta produção tanto de ânion superóxido, quanto de peróxido de hidrogênio, o que pode ser altamente prejudicial as células tronco e demais células da medula óssea, pois também há alta taxa de apoptose no local. Outro dado importante é que mesmo aos 2 meses de idade os camundongos ApoE-KO apresentaram maior produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio nas células de medula óssea do que os animais C57 sugerindo que desde de o início da lesão, as espécies reativas de oxigênio já estão presentes.

Em recente publicação, Turgeon (2012) induziu isquemia de membro em camundongos deficientes para Nox-2, uma das subunidades da NADPH oxidase. Os animais controle idosos (10 meses de idade) apresentavam isquemia aumentada e níveis altos de espécies reativas de oxigênio. Já os camundongos deficientes para Nox-2 apresentaram índices reduzidos de espécies reativas. Além disso, avaliou o potencial de regeneração das células progenitoras endoteliais (EPC) e observou que está significativamente reduzidas nos animais idosos que tem a Nox-2. Por outro lado, os animais com deficiência para Nox-2 apresentaram EPCs com capacidade regenerativa

elevada, contribuindo para reperfusão dos membros isquemiados.

Haddad e colaboradores (2011) também fizeram experimentos semelhantes a este, porém utilizaram camundongos deficientes para Nox-2 e induziram a hipercolesterolemia através de dieta rica em colesterol. Observaram que os camundongos Nox-2 deficientes apresentaram menor produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente menor desenvolvimento de placa aterosclerótica quando comparados com os animais que tinham a Nox-2. Logo, avaliaram também a atividade local de células progenitoras endoteliais e perceberam que o camundongo Nox-2 Knockout apresentava maior atividade quando comparado com o controle.

Portanto, fazendo uma analogia com o estudo de Turgeon (2012), pode-se sugerir que possivelmente, os animais ApoE-KO idosos e também os animais C57 idosos tem capacidade regenerativa prejudicada uma vez que suas células tronco são diretamente afetadas pelo envelhecimento e aumento das espécies reativas de oxigênio, o que explica a produção aumentada de ERO nas células de medula óssea, aorta e sangue. Além disso, pode-se afirmar que o papel da NADPH é crucial na produção de espécies reativas de oxigênio.

Em recente publicação de nosso laboratório, Porto e colaboradores (2011) demonstraram o potencial de regeneração das células mononucleares quando infundidas em camundongos ApoE-KO. Após o tratamento, foi observada a redução da produção de ânions superóxido nos cortes histológicos de placa aterosclerótica, além do recrutamento de células progenitoras endoteliais para o local da lesão.

Outro estudo que também demonstrou o potencial das células tronco na regeneração e reparo da aterosclerose e conseqüente diminuição de espécies reativas de oxigênio foi o de Tousoulis e colaboradores (2012). Para comprovar isto ele utilizou infusão de células progenitoras e GCSF em camundongos ApoE-KO e após algumas semanas observou a diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio e inflamação local.

Portanto, quando presentes em excesso, as espécies reativas de oxigênio

podem promover alterações em moléculas de DNA, proteínas, carboidratos e lipídios. A oxidação das biomoléculas pode levar a apoptose ou a lesão de tecidos (Granato, 2011) e logo, prejudicando também o funcionamento regular das células tronco.

Passando a análise do percentual de apoptose detectado pelo teste de Anexina, observamos que os animais ApoE-KO idosos apresentaram maior percentual de células de medula óssea em apoptose quando comparado com C57 idosos e demais grupos, o que sustenta a hipótese de que a aterosclerose associada ao envelhecimento, na medula óssea, é extremamente prejudicial e aumenta de forma drástica os níveis de ERO, o que leva a morte celular.

Já na análise das células de sangue e aorta, notamos que o envelhecimento, por sí só, foi suficiente para causar o aumento do número de células apoptóticas, enquanto que a aterosclerose associada ao envelhecimento não foi capaz de gerar maior percentual de apoptose, ao contrário do que ocorreu nas células mononucleares.

Diversos estudos já demonstraram que durante o desenvolvimento da placa aterosclerótica ocorre apoptose de células endoteliais, células de músculo liso e macrófagos (Rossig *et al.*, 2001). A apoptose possui um papel complementar, porém oposto na divisão celular como um mecanismo homeostático na morfogênese e reconstrução tecidual normal. Logo, este processo é importante para remoção de células com danos, infectadas ou potencialmente neoplásicas. Entretanto, tanto aumento de apoptose quanto diminuição de apoptose podem levar a consequências biológicas adversas (Palma, 2008).

Há fortes evidências de que o estresse oxidativo tem importância central nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos (Clutton, 1997; Vasconcelos, 2007). Tabas, por exemplo, (2009) associou a presença de apoptose na placa aterosclerótica com a morte de macrófagos durante o desenvolvimento da doença. Já Johnson, 2005, detectou presença de células musculares lisas em apoptose nas artérias carótidas de porcos (Johnson, 2005) assim como outros pesquisadores (Imai & Thomas, 1968; Kockx *et al.*,

2000).

Além da apoptose de células musculares lisas, estudos indicam que há também na aterosclerose, com o aumento da produção de ERO pelos macrófagos (especialmente ânion superóxido), a ativação de cascata cálcio dependente que acaba levando a apoptose de células endoteliais (Madesh *et al.*, 2005).

A oxidação da LDL leva a indução de apoptose celular. Estudos sugerem que a citotoxicidade (Nassem, 1987; Guyton, 1990) e a atividade pró-apoptótica da LDL oxidada são relacionadas principalmente aos oxisteróis. Panini e Sinensky demonstraram que fibroblastos que expressam CD36 internalizam a LDL oxidada e sofrem apoptose, enquanto que os que não expressam CD36 não internalizam a LDL oxidada, não sofrendo apoptose (Panini & Sinensky, 2001).

O nível de apoptose em paredes de vasos normais é muito baixo (Dimmeler *et al.*, 1996; Lutgens *et al.*, 1999). Na aterosclerose, aumenta o número de indutores de apoptose, que incluem lipoproteínas LDL oxidadas (Hardwick *et al.*, 1996; Nishio *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998), mediadores inflamatórios (Geng & Libby, 2002) e espécies reativas de oxigênio (Dimmeler & Zeiher, 2000; Napoli *et al.*, 2001). O nível de apoptose nas lesões ateroscleróticas avançadas são maiores ainda (Geng & Libby, 1995; Han *et al.*, 1995; Isner *et al.*, 1995; Björkerud & Björkerud, 1996; Lutgens *et al.*, 1999).

Estes estudos estão em consonância com os dados encontrados em nossos animais ApoE-KO idosos que apresentaram taxa elevada de apoptose nas células de aorta, uma vez que possuem lesão já bem estabelecida nesta idade.

Um estudo realizado por Galle e colaboradores, em amostras de sangue, também demonstrou que a hipercolesterolemia aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e também a taxa de apoptose das células. O grande responsável por causar aumento da oxidação é a LDL oxidada (Galle *et al.*, 1999). Também notamos que nossos animais ApoE-KO idosos apresentaram maior produção de ânion superóxido e peróxido no sangue e consequente elevação do percentual de apoptose.

Isner e colaboradores demonstraram aumento do percentual de células em apoptose em artérias coronárias e periféricas coletadas de 56 pacientes que sofreram revascularização percutânea pela primeira vez e também de locais com restenose (Isner *et al*, 1995). Bennett e colaboradores cultivaram células musculares lisas derivadas de tecidos de ateroma e quando comparados com células derivadas de doadores normais, encontraram maior número de apoptose e fragmentação de DNA (Bennett, 2005). Geng e Libby (1995) analisaram secções de ateroma humano provenientes de pacientes que receberam transplante de coração e que tinham doença arterial coronariana isquêmica. Para tanto utilizaram a técnica de TUNEL e observaram alta taxa de apoptose.

Em 1991, foi demonstrado que o peróxido de hidrogênio é capaz de induzir a apoptose celular, o que pode ser prevenido pela enzima catalase (Pierce *et al.*, 1991). Em nosso estudo observamos aumento da produção de peróxido de hidrogênio nas células mononucleares de medula óssea e no sangue dos animais ApoE-KO idosos e conseqüente elevação do percentual de apoptose nesses animais.

A apoptose de células musculares lisas é evidente após 30 minutos da injúria das artérias carótidas provocada por balão. Após o tratamento com antioxidantes este efeito foi reduzido, sugerindo a participação do dano oxidativo neste processo (Pollman, 1999).

Muskhelishvili mostrou que fígado de ratos idosos tinham maior taxa de apoptose que ratos jovens e concluíram que esta elevação estava relacionada ao aumento de espécies reativas de oxigênio (Muskhelishvili *et al.*, 1995). Este estudo também corrobora nossos dados de apoptose elevada nas células de medula óssea, sangue e aorta de animais C57 idosos.

Logo, a elevação dos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio se tornam prejudiciais ao funcionamento regular das células, levando a apoptose das células do sangue, aorta e especialmente da medula óssea, na qual a associação da aterosclerose ao envelhecimento provocou agravamento do

percentual de apoptose quando comparado aos demais grupos.

5.3 DANOS OXIDATIVOS AO DNA DAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA

O ensaio do cometa é uma técnica rápida e sensível na quantificação de lesões e detecção de efeitos de reparo no DNA em células individuais de eucariotos. O ensaio tem sido amplamente utilizado na genética médica, toxicológica, ecotoxicológica, em diagnósticos, tratamentos médicos, biomonitoramento ambiental, nutrição e outras aplicações.

Já se sabe que as espécies reativas de oxigênio são produzidas no local da placa aterosclerótica e a principal fonte é o complexo de enzima NADPH oxidase que está presente nas membranas celulares das células endoteliais, de músculo liso, macrófagos, neutrófilos e células tronco (Singh *et al.*, 1988). Logo, na presença de algum fator estressante ou patologia, como a aterosclerose, este complexo é ativado e produz em curto período de tempo uma grande quantidade de ânions superóxidos (O_2^-) (Singh *et al.*, 1988).

Logo, as espécies reativas de oxigênio causam danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial (Barreiros, 2006). Logo, adveio a necessidade de utilizar o ensaio do cometa a fim de observar possíveis danos ao DNA das células mononucleares de medula óssea.

Alguns estudos têm relacionado às doenças cardiovasculares com o estresse oxidativo e aparecimento de danos no DNA das células presentes nas placas ateroscleróticas dos indivíduos portadores dessas doenças. Entretanto, nenhum trabalho avaliou os danos oxidativos causados pela aterosclerose no DNA das células mononucleares de medula óssea. Em consonância com os resultados encontrados de aumento da produção de espécies reativas de oxigênio nas células mononucleares de medula óssea, o ensaio do cometa também detectou fragmentação do DNA destas células tanto em animais ateroscleróticos quanto em controle idosos. Também encontramos fragmentação do DNA aumentada nos animais ApoE-KO na comparação entre

jovens.

Portanto em nossa análise de genotoxicidade das células mononucleares de medula óssea observamos um aumento progressivo de fragmentação do DNA concomitante com a progressão da placa aterosclerótica e com o envelhecimento. Além disso, observamos que o envelhecimento, por si só, foi capaz de aumentar também a fragmentação de DNA.

Sabe-se que aproximadamente 2×10^4 danos no DNA ocorrem em cada célula por dia, a maioria via espécies reativas de oxigênio (ERO). Nas doenças cardiovasculares a produção de radicais livres aumenta mais ainda (Andreassi, 2003; Mahmoudi *et al.*, 2006).

Ballinger demonstrou o aumento da oxidação de DNA mitocondrial em aortas de camundongos ApoE-KO de 8 meses de idade comparando-os com controle C57. Ainda no mesmo estudo, verificaram que o dano oxidativo ao DNA mitocondrial já estava presente e mais elevado do que seu controle na idade de 3 semanas (Ballinger, 2002).

Em 2001, Botto e colaboradores publicaram um estudo que correlacionou a presença de fragmentos de DNA nos linfócitos de sangue periférico de pacientes com doença arterial coronariana utilizando o teste do micronúcleo (Botto *et al.*, 2001).

Gackowski, em 2001, demonstrou maior fragmentação no DNA de linfócitos de pacientes ateroscleróticos, além de diminuição nos níveis de vitamina C (Gackowski *et al.*, 2001).

Nosso estudo é o primeiro a avaliar o dano oxidativo no DNA de células mononucleares de medula óssea de animais ateroscleróticos. Um estudo que avaliou fragmentação do DNA de animais ApoE-KO, foi realizado por Folkmann (2007), no qual foram avaliados o nível de fragmentação do DNA de camundongos ApoE-KO de 12, 24, 32 e 70 semanas de idade. Para tal, utilizou suspensão celular de fígado, pulmão e aorta. Folkmann observou que nos camundongos mais idosos havia maior fragmentação no DNA das células do

fígado, enquanto que nas células de aorta e pulmão não encontrou diferença. Muitos trabalhos mostram que a ação das espécies reativas de oxigênio varia conforme o tecido, ou seja, sua ação é tecido-específica.

Recentemente, em nosso laboratório, Dalboni e colaboradores (2012) demonstraram, através do ensaio do cometa, aumento de fragmentação no DNA de células sanguíneas isoladas de camundongos ApoE-KO idosos (72 semanas) comparadas aos jovens (8 semanas de idade). Por outro lado, não encontrou diferença entre os animais idosos.

Já o estudo de De Flora e colaboradores (1997) demonstrou danos oxidativo no DNA de células, capturadas de aorta de pacientes ateroscleróticos, através resíduos de 8-Hidroxiguanina, um dos principais produtos da oxidação.

Sivonová (2007) demonstrou, através do ensaio do cometa, que ratos Wistar de 26 e 15 meses de idade tinham maiores danos oxidativo no DNA de linfócitos do que ratos de 6 meses de idade. Além disso, detectou níveis menores de antioxidantes nos ratos idosos.

O estudo de Swain e Subba (2011) também avaliou o efeito do envelhecimento sobre fragmentação do DNA através do ensaio do cometa e demonstrou que ratos de 2 anos de idade apresentaram maior nível de fragmentação de DNA de neurônios quando comparados com ratos de 7 dias e 6 meses de idade. Em estudo similar, Giovannelli e colaboradores (2003) também demonstraram através do ensaio do cometa maior nível de fragmentação no DNA da substância negra e hipotálamo de ratos de 24 meses de idade quando comparados com animais de 3 meses.

Considerando que encontramos níveis elevados de espécies reativas de oxigênio nas células de medula óssea tanto dos animais ApoE-KO quanto de C57 idosos, também observamos maiores níveis de fragmentação do DNA nos animais C57 idosos quando comparados com os animais C57 jovens, o que leva a crer que o envelhecimento por si só já acarreta em danos oxidativo ao DNA. Além disso, percebemos que a aterosclerose agrava os danos oxidativo, levando a maiores níveis de fragmentação mesmo quando comparamos os

ApoE-KO jovens com C57 jovens. Observamos também que a aterosclerose associada ao envelhecimento é capaz de agravar os danos oxidativos ao DNA quando comparado com os C57 idosos.

Andreassi em 2003 e Mahmoudi em 2006 também mostraram em seus estudos que danos ao DNA estavam presentes tanto nos linfócitos da circulação sanguínea quanto nas próprias placas ateroscleróticas de pacientes com doença arterial coronariana. Estes pacientes tinham quantidades elevadas de micronúcleos, ou seja, alta fragmentação de DNA, quando comparados com indivíduos saudáveis. Seus resultados foram associados ao aumento do estresse oxidativo na aterosclerose (Andreassi, 2003; Mahmoudi *et al.*, 2006).

Os macrófagos são os principais produtores de ERO durante a progressão da lesão aterosclerótica. Estes ativam o complexo enzimático NADPH oxidase que está presente em sua membrana plasmática, e oxidam o LDL na camada íntima da parede arterial (Sorescu *et al.*, 2002). As células endoteliais e de músculo liso também produzem espécies reativas de oxigênio que permanecem na circulação sanguínea. As ERO são altamente reativas e, portanto, interagem com as moléculas de DNA produzindo danos reparáveis como, por exemplo, quebras da fita de DNA (dupla ou simples), crosslinks, entre outros. No entanto, estes danos somente são reparáveis em um organismo saudável (Sorescu *et al.*, 2002).

Nossas células estão expostas diariamente a agentes oxidantes de todos os tipos, portanto é normal que sofram fragmentação de DNA. Entretanto mecanismos de reparo e enzimas antioxidantes agem continuamente gerando um balanço positivo nessa batalha. O resultado em um organismo saudável é o equilíbrio dessas duas forças: oxidantes e antioxidantes. Entretanto, em determinadas situações, como na aterosclerose, há um desbalanceamento neste sistema, ocasionando o dano oxidativo ao DNA.

Em nosso estudo utilizamos camundongos ateroscleróticos, ou seja, a produção de radicais livres nesses animais é exacerbada pela presença de hipercolesterolemia. Os sistemas antioxidante e de reparo, provavelmente, não são capazes de corrigir todos os danos na molécula de DNA destes animais,

gerando dessa forma um aumento da fragmentação, devido ao quadro de estresse oxidativo, que foi evidenciada nesse grupo pelo ensaio do cometa e pela citometria de fluxo.

Esses dados são comprovados por outros pesquisadores que estudaram o efeito da aterosclerose na produção de ERO, como o estudo de Satoh em 2008 que mostra uma maior taxa de fragmentação de DNA nas células progenitoras endoteliais de pacientes com aterosclerose (Satoh *et al.*, 2008). Guo, também, em 2001 relatou a presença de DNA oxidado nas células de aorta de camundongos com 26 meses de idade que foram comparados com animais de 6 meses (Guo *et al.*, 2001).

Outros estudos mostram que as ERO são tecido-específicas, ou seja, em seu estudo com ratos senescentes, Fraga mostrou que os radicais livres não agem em todos tecidos de maneira igual. Ele encontrou altos níveis de oxidação de DNA no fígado, rim e intestino, mas no cérebro e nos testículos o índice de dano era considerado normal (Fraga *et al.*, 1990). Já os nossos dados revelaram aumento de fragmentação do DNA das células mononucleares de medula óssea tanto nos animais idosos quanto nos animais ateroscleróticos.

Humphreys e colaboradores submeteram, em 2007, pessoas com idade entre 75-82, 63-70, 20-35 anos a coleta de sangue periférico para análise pelo ensaio do cometa. Em seu estudo, encontraram maiores níveis de fragmentação do DNA nas pessoas idosas, e em contrapartida, maiores níveis também de antioxidantes circulantes, sugerindo a presença de um sistema balanceador ativo mesmo em idosos (Humphreys *et al.*, 2007).

Por outro lado, em nossos resultados os animais C57 idosos apresentaram maior fragmentação de DNA quando comparados com os C57 jovens, seguindo os dados da maior parte da literatura, na qual observamos que o envelhecimento causa aumento do dano oxidativo no DNA das células de medula óssea, o que também corrobora os dados encontrados de aumento da produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio nas células de medula óssea e além disso aumento do percentual de apoptose.

A fragmentação do DNA dos animais ApoE-KO idosos foi observada com maior intensidade ainda que nos animais C57 idosos. Diante disso, pode-se sugerir que a doença acelera a produção de espécies reativas de oxigênio e percentual de apoptose, conforme verificamos em nossos resultados, provavelmente, como os estudos demonstram, via ativação de NADPH oxidase presente nas células tronco da medula óssea, na qual possivelmente há grande prejuízo do sistema antioxidante local. Portanto, o envelhecimento provoca aumento das espécies reativas de oxigênio, mas quando associado a aterosclerose, o resultado é mais grave.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Neste estudo observamos que o nível de ânions superóxido encontrado nas células mononucleares de medula óssea, sangue e aorta foi maior em animais ApoE-KO idosos quando comparados com os outros grupos, incluindo o grupo C57 idoso. Isto sugere que a aterosclerose quando associada ao envelhecimento provoca um aumento ainda maior na produção de ânions superóxido. Conforme verificamos neste estudo, uma das consequências deste aumento é a elevação da taxa de apoptose e fragmentação do DNA. O envelhecimento também provocou aumento da produção de ânions superóxido nas células de medula, sangue e aorta dos animais C57 idosos quando comparado com os C57 jovens, nos quais também observamos alta taxa de apoptose e fragmentação do DNA. A produção de peróxido de hidrogênio não seguiu a mesma homogeneidade destacada pelo ânion superóxido. Observamos um aumento significativo na produção de peróxido de hidrogênio nas células de medula óssea e no sangue de animais ApoE-KO idosos quando comparados com os outros grupos, incluindo o C57 idoso. O grupo C57 idoso também apresentou aumento da produção de peróxido de hidrogênio nas células de medula óssea quando comparado com seu controle jovem, mas não apresentou aumento nas células sanguíneas. Já nas células endoteliais de aorta, os níveis de peróxido não sofreram alterações entre os grupos, porém aparentemente há nível baixo de peróxido de hidrogênio em todos os grupos. Possivelmente o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio encontrado nos grupos se deve a enzima NADPH oxidase que tem papel fundamental nas doenças cardiovasculares, especialmente na aterosclerose, uma vez que pode ser encontrada nas células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e até mesmo na membrana das células tronco. Por outro lado, o sistema antioxidante atua na tentativa de equilibrar a produção de ERO, entretanto, com o envelhecimento declina também a atuação do sistema antioxidante capaz de reverter este quadro, conforme sugerimos em nosso estudo. Além disso, outros estudos demonstram que a atividade das enzimas antioxidantes são tecido-específicas, o que pode ser considerado indício da variação encontrada na produção de peróxido de hidrogênio nas células sanguíneas de C57 idoso e aorta dos animais. Com maior destaque está a análise das células de medula óssea que apresentaram alta produção de

ânions superóxido e de peróxido de hidrogênio, ou seja, a fonte de produção de células sanguíneas e células tronco de todo o organismo, que comumente apresenta ambiente com baixa tensão de oxigênio, é afetada pelo desequilíbrio oxidativo causado pelo envelhecimento e pela aterosclerose. Além disso, o sangue e aorta dos animais ateroscleróticos e idosos também apresentaram alta produção de espécies reativas, especialmente ânion superóxido, sugerindo, portanto a ativação da enzima NADPH oxidase e *downregulation* de enzimas antioxidantes. Por fim, pode-se destacar que a aterosclerose aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio assim como o envelhecimento, porém quando estes dois parâmetros são cumulados a tensão oxidativa é ainda maior o que faz com que haja insuficiência do sistema antioxidante.

7 ANEXO

7.1 ARTIGO PUBLICADO REFERENTE À TESE

<https://www.mdpi.com/1422-0067/14/2/3325/pdf>

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACCINNI R, ROSINA M, BAMONTI F, et al. Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.** 2006,16(2):121-7.

ANDREASSI MG. Coronary atherosclerosis and somatic mutations: an overview of the contributive factors for oxidative DNA damage. **Mutat Res.** 2003, 543(1):67-86.

AKILA VP, HARISHCHANDRA H, D'SOUZA V, et al. Age related changes in lipid peroxidation and antioxidants in elderly people. **Indian J Clin Biochem.** 2007, 22(1):131-4.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, et al. **Molecular Biology of the Cell.** 4 ed. New York: Garland Science, 2002.

ALBRINK MJ, MAN EB. Serum triglycerides in coronary artery disease. **AMA Arch Intern Med.** 1959, 103(1):4-8.

ALENCAR YMG, EURICO TCF, PASCHOAL MP. Fatores de Risco para Aterosclerose em uma População Idosa Ambulatorial na Cidade de São Paulo. **Arq Bras Cardiol.** 2000, 74(3): 181-188.

ALVAREZ-LEITE JI, OLIVEIRA DR., PELUZIO MCG. **Dislipidemias.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p.196-211.

ANSELMINI M, GARBIN U, AGOSTINI P, et al. Plasma levels of oxidized-low-density lipoproteins are higher in patients with unstable angina and correlated with angiographic coronary complex plaques. **Atherosclerosis.** 2006,185(1):114-20.

ANTONIADES C, TOUSOULIS D, TENTOLOURIS C, et al. Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. **Herz.** 2003, 28 (7): 628-38.

ANTONOPOULOS AS, LEE R, MARGARITIS M, et al. Adiponectin as a regulator of vascular redox state: therapeutic implications. **Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.** 2011, 6(2):78-88.

ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. **Science.** 1998, 281(5381):1305-8.

ASHOK BT, AHMAD J, QADRI A, et al. Anti-ROS-DNA monoclonal antibody as molecular probe for oxidative DNA damage. **Biochem Mol Biol Int.** 1997, 43(6):1219-29.

AUGUSTI, Paula Rossini. **Envolvimento do estresse oxidativo e hipercolesterolemia na aterosclerose e avaliação do efeito protetor do carotenoide astaxantina.** 2010. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio grande do sul, Rio Grande do Sul, 2010.

AVERILL MM, BENNETT BJ, RATTAZZI M, et al. Neither antioxidants nor genistein inhibit the progression of established atherosclerotic lesions in older apoE deficient mice. **Atherosclerosis.** 2009, 203(1):82-8.

BALLINGER SW, PATTERSON C, KNIGHT-LOZANO CA, et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. **Circulation.** 2002, 106(5):544-9.

BARBOSA KB, COSTA NM, ALFENAS RC, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** 2010, 23(4).

BARREIROS ALBS, DAVID JM. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova.** 2006, 29(1): 113-123,

BARRY-LANE PA, PATTERSON C, VAN DER MERWE M, et al. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. **J Clin Invest.** 2001, 108(10):1513-22.

BECKMAN KB, AMES BN. The free radical theory of aging matures.. **Physiol**

Rev. 1998, 78(2):547-81.

BJORKERUD S, BJORKERUD B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. **Am J Pathol.** 1996, 149:367–380.

BENNETT MR, EVAN GI, SCHWARTZ SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary. **J Clin Invest** 1995, 95:2266–2274.

BERRA CM, MENCK CFM, et al. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. **Quím Nova.** 2006, 29(6).

BERLINER JA, NAVAB M, FOGELMAN, AM. Atherosclerosis: basic mechanisms, oxidation, inflammation and genetics. **Circulation.** 1995, 91: 2488-2496.

BERNARD K, KRAUSE KH. The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev.** 2007, 87(1):245-313.

BERTOLAMI, MC. The connection between lipoproteins and atherosclerosis. **Rev Soc Cardiol.** 2000, 6:694-9.

BINDER CJ, CHANG MK, SHAW PX, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. 2002, **Nat Med.** 8:1218-1226.

BOGLIOLIO BG. **Patologia.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BONTHU S, HEISTAD DD, CHAPPELL DA, et al. Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of endotheliumdependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 1997, 17(11):2333-40.

BOTTO N, RIZZA A, COLOMBO MG. et al. Evidence for DNA damage in

patients with coronary artery disease. **Mutat Res.** 2001, 493: 23–30.

BOVERIS A, OSHINO N, CHANCE B. The cellular production of hydrogen peroxide. **Biochem.J.** 1972, 128: 617–630.

BRESLOW JL. Mouse models of atherosclerosis. **Science.** 1996, 272: 685-688.
BRESLOW JL. Mouse models of atherosclerosis. **Science,** 1996, 272:685-688.

BRESLOW JL. Transgenic mouse models of lipoprotein metabolism and atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci,** 1993, 90(18):8314-8.

BRITO, Paula Matos. **The role of resveratrol in the context of atherosclerosis prevention: molecular mechanisms involved in apoptosis and cell proliferation.** 2007. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra, Portugal, 2007.

BUGGISCH M, ATEGHANG B, RUHE C, et al. Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. **J Cell Sci.** 2007, 1;120(5):885-94.

BUTTERFIELD DA. Proteomics: a new approach to investigate oxidative stress in Alzheimer's disease brain. **Brain res.** 2004, 1000:1-7.

CADENAS E. Basic mechanisms of antioxidant activity. **Biofactors.** 1997, 6(4):391-7.

CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circ Res.** 2000, 87(10):840-4.

CAND F, VERDETTI J. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation in the major organs of the aging rats. **Free Radic Biol Med.** 1989, 7(1):59-63.

CANNIZZO B, LUJÁN A, ESTRELLA N, et al. Insulin resistance promotes early

atherosclerosis via increased proinflammatory proteins and oxidative stress in fructose-fed ApoE-KO mice. **Exp Diabetes Res.** 2012, 2012:941304.

CARVALHO MHC, COLAÇO AL, FORTES ZB. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2006, 50(2).

CASÓS K, SÁIZ MP, RUIZ-SANZ JI, MITJAVILA MT. Atherosclerosis prevention by a fish oil-rich diet in apoE(-/-) mice is associated with a reduction of endothelial adhesion molecules. **Atherosclerosis.** 2008, 201(2):306-17.

CAVE AC, BREWER AC, NARAYANAPANICKER A, et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. **Antioxid Redox Signal.** 2006, 8(5-6):691-728.

CERADINI DJ, KULKARNI AR, CALLAGHAN MJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. **Nat Med.** 2004, 10:858-864.

CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev.** 1979,59(3):527-605.

CHAMPE PC, HARVEY RA., FERRIER DR. Lipids metabolism. In: *Biochemistry*, 4 ed.. 2007, 520p.

CHEN K, KIRBER MT, XIAO H, et al. Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. **J Cell Biol.** 2008; 181: 1129-39.

CHUNG HY, SUNG B, JUNG KJ, et al. The molecular inflammatory process in aging. **Antioxid Redox Signal.** 2006, 8: 572–581.

CLEMPUS RE, GRIENGLING KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. **Cardiovasc Res.** 2006, 71(2):216-25.

CLUTTON S. The importance of oxidative stress in apoptosis. **Br Med Bull.** 1997, 53(3):662-8.

CSISZAR A, LABINSKY N, ZHAO X, et al. Vascular superoxide and hydrogen peroxide production and oxidative stress resistance in two closely related rodent species with disparate longevity. **Aging Cell**. 2007, 6(6):783-97.

COLEMAN R, HAYEK T, KEIDAR S, et al. A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice. **Acta Histochem**. 2006, 108(6):415-24.

COLLINS AR, LYON CJ, XIA X, et al. Age-accelerated atherosclerosis correlates with failure to upregulate antioxidant genes. **Circ Res**. 2009, 104:42–54.

COLLINS AR. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutat Res**. 2009, 681:24–32.

COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS TR. **Bases patológicas das doenças**. 7 ed. Guanabara Koogan, 2008.

COSTA, DC. **Adaptação metabólica em granulócitos humanos induzida pelo processo de envelhecimento e Diabetes Mellitus: papel das vias de sinalização cAMP/PKA, Akt/PKB, p38 MAPK e fosfoinosítídeos**. 2006. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2006.

COX LS, FARAGHER RG. From old organisms to new molecules: integrative biology and therapeutic targets in accelerated human ageing. **Cell Mol Life Sci**. 2007, 64(19-20):2620-41.

CUI K, LUO X, XU K, et al. Role of oxidative stress in neuro-degeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Pr Neuro-Psych biol psych**. 2004, 28(5):771-799.

DALBONI S, CAMPAGNARO B, TONINI C, et al. The Concurrence of Hypercholesterolemia and Aging Promotes DNA Damage in Apolipoprotein E-Deficient Mice. **Open Journal of Blood Diseases**. 2012, 2(3): 51-55.

DE FLORA S, IZZOTTI A, WALSH D, et al. Molecular epidemiology of atherosclerosis. **FASEB J**. 1997, 11(12):1021-31.

DESHPANDE LS, LIMBRICK DD JR, SOMBATI S, et al. Activation of a novel injury-induced calcium-permeable channel that plays a key role in causing extended neuronal depolarization and initiating neuronal death in excitotoxic neuronal injury. **J Pharmacol Exp Ther**. 2007, 322(2):443-52.

DESPRÉS J-P, LAMARCHE B, MAURIÈGE P, et al. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. **N Engl J Med**. 1996, 334:952–957.

DIMMELER S, HAENDELER J, RIPPMANN V, et al. Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. **FEBS Lett**. 1996,399(1-2):71-4.

DIMMELER S, ZEIHNER AM. Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. **Regul Pept**. 2000, 90:19-25.

DORIA E, BUONOCORE D, FOCARELLI A, et al. Relationship between human aging muscle and oxidative system pathway. **Oxid Med Cell Longev**. 2012, 2012:830257.

D'USCIO LV, BAKER TA, MANTILLA CB, et al. Mechanism of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2001, 21(6):1017-22.

DUSTING GJ, SELEMIDIS S, JIANG F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2005,1:97-103.

DWORAKOWSKI R, ANILKUMAR N, ZHANG M, et al. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. **Biochem Soc Trans**. 2006,34(5):960-4.

ELIASSON P, JÖNSSON JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. **J Cell Physiol.** 2010, 222(1):17-22.

ESPINOLA-KLEIN C, RUPPRECHT HJ, BICKEL C, et al. Glutathione peroxidase-1 activity, atherosclerotic burden, and cardiovascular prognosis. **Am J Cardiol.** 2007,99(6):808-12.

ESPER RJ, NORDABY RA, VILARIÑO JO, et al. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. **Cardiovasc Diabetol.** 2006, 23:5-4.

EWERS I, RIZZO LV, FILHO JK. Imunologia e envelhecimento. **Einstein.** 2008, 6(1):13-20.

ESTERBAUER H, GEBICKI J, PUHL H, et al. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. **Free Radic Biol Med.** 1992, 13(4):341-90.

FAYAD ZA. Cardiovascular Molecular Imaging. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2009, 29(7): 981–982.

FAZIO S, LINTON MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. **Front Biosci.** 2001, 1:6.

FRAGA CG, SHIGENAGA MK, PARK JW, et al. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. **Proc Natl Acad Sci.** 1990, 87(12):4533-7.

FARRUGIA G, BALZAN R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Front Oncol.** 2012;2:64.

FAVERO, Giovanni Marino. **Efeito citotóxico causado por emulsão lipídica contendo 7 –cetocolesterol em cultura de células tumorais.** Dissertação de Mestrado. 2003. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo.

FERRARI CK. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of healthy aging. **Biogerontology**. 2004, 5(5):275-89.

FERRARI CK, FRANÇA EL, HONORIO-FRANÇA AC. Nitric oxide, health and disease. **J Appl Biomed**. 2009,7:163-73.

FERRAZ, Mara Lucia Da Fonseca. **Avaliação morfológica da aterosclerose em aortas de pacientes autopsiados**. Tese de mestrado. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba. Minas Gerais. 2008.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras**. 1997, 43(1).

FINKEL T, HOLBROOK NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**. 2000, 9;408(6809):239-47.

SWIRSKI FK, LIBBY P, AIKAWA E, et al. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. **J Clin Invest**. 2007,117(1):195-205.

FOLKMANN JK, LOFT S, MØLLER P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE^{-/-} and wild-type mice. **Mutagenesis**. 2007, 22(2):105-10.

FRANSSEN R, MONAJEMI H, STROES ES. Obesity and dyslipidemia. **Med Clin North Am**. 2008, 95(5):893-902.

FUKAI T, GALIS ZS, MENG XP, et al. Vascular expression of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. **J Clin Invest**. 1998, 15;101(10):2101-11.

FUKAGAWA NK. Aging: is oxidative stress a marker or is it causal? **Proc Soc Exp Biol Med**. 1999, 222:293-298.

GACKOWSKI D, KRUSZEWSKI M, JAWIEN A, et al. Further evidence that

oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. **Free Radic Biol Med.** 2001, 15;31(4):542-7.

GARDNER PR, RAINERI I, EPSTEIN LB, et al. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. **J. Biol. Chem.** 1995, 270 (22): 13399–405.

GALIS ZS, SUKHOVA GK., LARK M. et al. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. **J Clin.Invest.** 1994, 94: 2493-2503.

GALLE J, SCHNEIDER R, HEINLOTH A, et al. Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. **Kidney Int.** 1999,55(4):1450-61.

GAUTAM N, DAS S, MAHAPATRA SK, et al. Age associated oxidative damage in lymphocytes:. **Oxid Med Cell Longev.** 2010, 3(4):275-282.

GAVA AA, ZANONI JN. Envelhecimento celular. **Arq Ciênc Saúde Unipar** 2005, 9(1):41-6.

GENESTRA M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cell Signal.** 2007,19(9):1807-19.

GENG YJ, LIBBY P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin 1b converting enzyme. **Am J Path.** 1995, 479 (147):251–266.

GENG YJ, LIBBY P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2002, 22:1370-1380.

GERSCHMAN R, GILBERT D, NYE SW, et al. Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. **Science.** 1954, 119: 623–626,

GIANNINI, SD. História natural da Aterosclerose. **Rev Soc Cardiol Estado de**

São Paulo. 2000, 6:677-85.

GIASSON BI, ISCHIROPOULOS H, LEE VM, et al. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radic Biol Med.** 2002, 32(12):1264-75.

GILLE G, SIGLER K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiol.** 1995,40(2):131-52.

GOTTLIEB, MG, BONARDI G, MORIGUCHI EH. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica.** 2005, 15(3).

GRANATO, Daniel. **Associação entre atividade antioxidante in vitro e características, químicas, sensoriais, cromáticas e comerciais de vinhos tintos Sul-Americanos.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

GRIENGLING KK, MINIERI CA, OLLERENSHAW JD, et al. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. **Circ Res.** 1994, 74(6):1141-8.

GRIVICICH V, REGNER A, ROCHA AB. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Rev Bras Canc.** 2007, 53(3): 335-343.

GU P, ISHII Y, SPENCER TA, et al. Function-structure studies and identification of three enzyme domains involved in the catalytic activity in rat hepatic squalene synthase. **J Biol Chem.** 1998, 273(20):12515-25.

GUO ZM, YANG H, HAMILTON ML, et al. Effects of age and food restriction on oxidative DNA damage and antioxidant enzyme activities in the mouse aorta. **Mech Ageing Dev.** 2001,;122(15):1771-86.

GUYTON JR, BLACK BL, SEIDEL CL. Focal toxicity of oxysterols in vascular smooth muscle cell culture. A model of the atherosclerotic core region. **Am J Pathol.** 1990,137(2):425-34.

GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. **Biochem Biophys Res Commun.** 2010; 393(4):561-4.

GUZIK TJ, SADOWSKI J, KAPELAK B, et al. Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2004, 24(9):1614-20.

GYLLENHAMMAR H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. **J Immunol Methods.** 1987,97(2):209-13.

HADDAD P, DUSSAULT S, GROLEAU J, et al. Nox2-derived reactive oxygen species contribute to hypercholesterolemia-induced inhibition of neovascularization: effects on endothelial progenitor cells and mature endothelial cells. **Atherosclerosis.** 2011,217(2):340-9.

HEGYI L, SKEPPER JN, CARY NR, et al. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. **J Pathol.** 1996,180:423–442.

HARDWICK SJ, HEGYI L, CLARE K, et al. Apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low density lipoprotein. **J Pathol.** 1996,179:294-302.

HAN DK, HAUDENSCHILD CC, HONG MK et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. **Am J Pathol.** 1995,147:267–277.

HALLIWELL B, CROSS CE. Oxygen-derived species:the irrelation to human disease andenviron- mental stress. **Environ.Health Per- spect.** .1994,102: 5–12.

Halliwell B, Gutteridge JM. **Free Radical in Biology and Medicine**, 3 ed., Oxford University Press: Oxford, 2007.

HANSSON GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **N Engl J Med.** 2005, 352(16):1685-95.

HANSSON GK, LIBBY P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature Rev Immunol.** 2006, (6): 508-519.

HARPER EJ. Changing perspectives on aging and energy requirements: aging, body weight and body composition in humans, dogs and cats. **J Nutr.** 1998, 128.

HARMAN D. Aging: overview. **Ann NY Acad Sci.** 2001, 928: 1–21.

HAYFLICK L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Exp Cell Res.** 1965, 37:614–636.

HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res.** 1961,25:585–621.

HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **J Gerontol.** 1956,11(3):298-300.

HARMAN D. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. **Biogerontology.** 2009, 10(6):773-81.

HAZZARD WR. Atherosclerosis and aging: a scenario in flux. **Am J Cardiol.** 1989, 63:20H-24H.

HERRMANN J, SOARES SM, LERMAN LO, et al. Potential role of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerosis: aspects of a protein quality disease. **J Am Coll Cardiol.** 2008, 51(21):2003-10.

HODIS HN, MACK WJ, LABREE L, et al. Alpha-tocopherol supplementation in healthy individuals reduces low-density lipoprotein oxidation but not atherosclerosis: the Vitamin E Atherosclerosis Prevention Study (VEAPS). **Circulation.** 2002,106:1453–1459.

HOEN PA, VAN DER LANS CA, VAN ECK M, et al. Aorta of ApoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. **Circ Res.** 2003, 93:262–269.

HOFKER MH, VAN VLIJMEN BJ, HAVEKES LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis.** 1998, 137(1):1-11.

HUNT CR, SIM JE, SULLIVAN SJ, et al. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. **Cancer Res.** 1998,58(17):3986-92.

Yang H, Mohamed AS, Zhou SH. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. **Lipids Health Dis.** 2012, 2:11-85.

HUSSAIN MM, MAHLEY RW, BOYLES JK, et al. Chylomicron metabolism. Chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. **J Biol Chem.** 1989, 264(30):17931–17938.

HUSSAIN MM, MAHLEY RW, BOYLES JK, et al. Chylomicron-chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits. Factors that modify tissue-specific uptake. **J Biol Chem.** 1989, 264(16):9571–9582.

HANSSON GK, LIBBY P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nat Rev Immunol.** 2006, 6(7):508-19.

HEISSIG B, HATTORI K, DIAS S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kitligand. **Cell.** 2002,109:625-637.

HENNIG B, CHOW CK. Lipid peroxidation and endothelial cell injury: implications in atherosclerosis. **Free Radic Biol Med.** 1988, 4(2):99-106.

HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature**. 2000, 407:770-76.

HOFKER MH, VAN VLIJMEN BJ, HAVEKES LM. Transgenic mouse models to study the role of APOE in hyperlipidemia and atherosclerosis. **Atherosclerosis**. 1998, 137(1):1-11.

HU Y, ZHANG Z, TORSNEY E, et al. Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice. **J Clin Invest**. 2004, 113(9):1258-65.

HUMPHREYS V, MARTIN RM, RATCLIFFE B, et al. Age-related increases in DNA repair and antioxidant protection: a comparison of the Boyd Orr Cohort of elderly subjects with a younger population sample. **Age Ageing**. 2007, 36(5):521-6.

ISNER JM, KEARNEY M, BORTMAN S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. **Circulation**. 1995, 91:2703–2711.

IMAI H, THOMAS WA. Cerebral atherosclerosis in swine: Role of necrosis in progression of diet-induced lesions from proliferative to atheromatous stage. **Exp Mol Pathol**. 1968,8:330–357.

JASCOLKA, Tatianna Lemos. **Efeitos do Quefir no Perfil Lipídico, Estresse Oxidativo e Aterosclerose de Camundongos Deficientes em Apolipoproteína E**. Dissertação de mestrado. Belo Horizonte, Minas Gerais. 2010.

JANG YY, SHARKIS SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. **Blood**. 2007,110:3056–3063.

JANSEN-DÜRR P, OSIEWACZ HD. Healthy ageing: a question of stress, damage and repair. Meeting on mechanisms of biological ageing. **EMBO Rep**.

2002, 3(12):1127-32.

JAWIEŃ J, NASTAŁEK P, KORBUT R. Mouse models of experimental atherosclerosis. **J Physiol Pharmacol**. 2004, 55(3):503-17.

JIN Z, EL-DEIRY WS. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biol Ther**. 2005, 4(2):139-63.

JOHNSON LL, SCHOFIELD L, DONAHAY T, et al. ^{99m}Tc-annexin V imaging for in vivo detection of atherosclerotic lesions in porcine coronary arteries. **J Nucl Med**. 2005,46(7):1186-93.

JONES SA, O'DONNELL VB, WOOD JD, et al. Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. **Am J Physiol**. 1996, 1(2):H1626-34.

JONASSON L, HOLM J, SKALLI O, et al. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. **Arteriosclerosis**. 1986,6(2):131-8.

JUDGE S, LEEUWENBURGH C. Cardiac mitochondrial bioenergetics, oxidative stress, and aging. **Am J Physiol Cell Physiol**. 2007, 292:1983–92.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAWASHIMA Y, CHEN J, SUN H, et al. Apolipoprotein E deficiency abrogates insulin resistance in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**. 2009 Jul;52(7):1434-41.

KHALEELI E, PETERS SR, BOBROWSKY K, et al. Diabetes and the associated incidence of subclinical atherosclerosis and coronary artery disease: Implications for management. **Am Heart J**. 2001,141(4):637-44.

KEANEY JF JR, VITA JA. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. **Prog Cardiovasc Dis.** 1995, 38(2):129-54.

KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer.** 1972, 26(4):239-57.

KEYS A, ANDERSON JT, GRANDE F. Prediction of serum cholesterol responses of man to changes in fats in the diet. **Lancet.** 1957,959-66.

KIRKMAN HN, GAETANI GF. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **Trends Biochem Sci.** 2007, 32(1):44-50.

KOCKX MM, MEYER GR, MUHRING J et al. Distribution of cell Circulation replication and apoptosis in atherosclerotic plaques of cholesterol fed rabbits. **Atherosclerosis.** 1996,120:115–124.

KOCKX MM, MEYER GR, MUHRING J et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. **Circulation.** 1998, 97:2307–2315.

KOPP HG, AVECILLA ST, HOOPER AT, et al. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. **Physiology.** 2005, 20: 349-356.

KREGEL KC, ZHANG HJ. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2007, 292(1):R18-36.

KROEMER G, MARIÑO G, LEVINE B. Autophagy and the integrated stress response. **Mol Cell.** 2010,40(2):280-93.

KUNITOMO M. [Oxidative stress and atherosclerosis]. **Yakugaku Zasshi.** 2007,127(12):1997-2014.

LAKATTA EG, LEVY D. Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. **Circulation**. 2003, 107(1):139-46.

LASSEGUE B, GRIENGLING KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2010, 30:653–661.

LASSÈGUE B, CLEMPUS RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2003,285(2):R277-97.

LEE R, MARGARITIS M, CHANNON KM, et al. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. **Curr Med Chem**. 2012, 19(16):2504-20.

LEE J, KOO N , MIN DB. Reactive oxygen Species, aging, and antioxidative nutraceuticals. **Rev Food Sci Saf**. 2004, 3(1): 21–33.

LEE MY, LI H, XIAO Y, et al. Chronic administration of BMS309403 improves endothelial function in apolipoprotein Edeficient mice and in cultured human endothelial cells. **Br J Pharmacol**. 2011, 162(7):1564-76.

LEIST M, JAATTELA M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. **Nat.Rev.Mol.Cell Biol**. 2001, 2: 589-598.

LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**. 2008, 132:27-42.

LI Z, LI L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. **Trends Biochem Sci**. 2006, 31:589-595.

LI J, WANG Q, CHAI W, et al. Hyperglycemia in apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. **Cardiovasc Diabetol**. 2011,10:117.

LIANG Q, ZHOU B. Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. **Mol Biol Cell**. 2007, 18:4741–4749.

LING J, SÖLL D. Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. **Proc Natl Acad Sci**. 2010, 107(9):4028-33.

LI AC, GLASS CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. **Nat Med**. 2002, 8(11):1235-42.

LINTON S, DAVIES MJ, DEAN RT. Protein oxidation and ageing. **Exp Gerontol**. 2001,36(9):1503-18.

LOO G. Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). **J Nutr Biochem**. 2003,14(2):64-73.

LÖNN ME, DENNIS JM, STOCKER R. Actions of "antioxidants" in the protection against atherosclerosis. **Free Radic Biol Med**. 2012, 53(4):863-84.

LOFT S, POULSEN HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. **J Mol Med**. 1996,74(6):297-312.

LUND DD, CHU Y, MILLER JD, et al. Protective effect of extracellular superoxide dismutase on endothelial function during aging. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 2009, 296(6):H1920-5.

LUQUE, Maria Carolina Aquino. **Papel da CD100 na patogênese da aterosclerose**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

LUTGENS E, MUINCK ED, KITSLAAR PJ, et al. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. **Cardiovasc Res**. 1999, 41:473-479.

MACH F, SCHÖNBECK U, BONNEFOY JY, et al. Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. **Circulation**. 1997, 96(2):396-9.

MAHMOUDI M, MERCER J, BENNETT M. DNA damage and repair in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**. 2006, 71(2):259-68.

MARTINET W, KNAAPEN MW, DE MEYER GR, et al. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. **Circulation**. 2002, 106(8):927-32.

MEIR KS, LEITERSDORF E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2004, 24(6):1006-14.

MOHAZZAB KM, KAMINSKI PM, WOLIN MS. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. **Am J Physiol**. 1994, 266(6 Pt 2):H2568-72.

MADESH M, HAWKINS BJ, MILOVANOVA T, et al. Selective role for superoxide in InsP3 receptor-mediated mitochondrial dysfunction and endothelial apoptosis. **J Cell Biol**. 2005, 170:1079–1090.

MADAMANCHI NR, VENDROV A, RUNGE MS. Oxidative stress and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2005, 25(1):29-38.

MAHLEY RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science**. 1988, 240(4852):622-30.

MARTIN LJ, PRICE AC, MCCLENDON KB, et al. Early events of target deprivation/axotomy-induced neuronal apoptosis in vivo: oxidative stress, DNA damage, p53 phosphorylation and subcellular redistribution of death proteins. **J Neurochem**. 2003, 85(1):234-47.

MASSUDI H, GRANT R, BRAIDY N, et al. Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. **PLoS One**. 2012, 7(7):42357.

MATTHEWS C, GORENNE I, SCOTT S, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. **Circ Res**. 2006, 99(2):156-64.

MATHEWS ST, RAKHADE S, ZHOU X, et al. Fetuin-null mice are protected against obesity and insulin resistance associated with aging. **Biochem Biophys Res Commun**. 2006, 350(2):437-43.

MAYES PA. Biologic oxidation. **Harper's biochemistry**. 1990; 105-11.

MCCORD JM, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). **Free Radic Biol Med**. 1988, 5(5-6):363-9.

MCGREGOR GP, BIESALSKI HK. Rationale and impact of vitamin C in clinical nutrition. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**. 2006, 9:697-703.

MENDOZA-NÚÑEZ VM, RUIZ-RAMOS M, SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ MA, et al. Aging-related oxidative stress in healthy humans. **Tohoku J Exp Med**. 2007, 213(3):261-8.

MEIER P, FINCH A, EVAN G. Apoptosis in development. **Nature**. 2000, 407:796-801.

MELLO FILHO AC, HOFFMAN ME, MENEGHINI R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem J**. 1983, 218: 273-5.

MEYRELLES SS, PEOTTA VA, PEREIRA TM, et al. Endothelial dysfunction in the apolipoprotein E-deficient mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. **Lipids Health Dis**. 2011, 14:10-211.

MILLER AA, DE SILVA TM, JACKMAN KA, et al. Effect of gender and sex

hormones on vascular oxidative stress. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 2007, 34(10):1037-43.

MILLER WL, HUANG N, PANDEY AV, et al. P450 oxidoreductase deficiency: a new disorder of steroidogenesis. **Ann N Y Acad Sci.** 2005,1061:100-8.

MINAMINO T, KOMURO I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis. **Circ Res.** 2007,100(1):15-26.

MOGHADASIAN MH, MCMANUS BM, NGUYEN LB, et al. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. **FASEB J.** 2001,15(14):2623-30.

MOGHADASIAN MH, NGUYEN LB, SHEFER S, et al. Histologic, hematologic, and biochemical characteristics of apo E-deficient mice: effects of dietary cholesterol and phytosterols. **Lab Invest.** 1999, 79(3):355-64.

MONTI D, TROIANO L, TROPEA F, et al. Apoptosis--programmed cell death: a role in the aging process? **Am J Clin Nutr.** 1992, 55(6):1208S-1214S.

MONTEIRO, Marcela Piedade. **Bebida a base de subproduto da uva: efeito sobre o estresse oxidativo e marcadores de risco de doenças cardiovasculares em mulheres saudáveis.** Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

MOTA, MP, FIGUEIREDO PA, DUARTE JA. Teorias biológicas do envelhecimento. **Rev Port Cienc Desp.** 2004, 4(1):81–110.

MUGGE A, BOGER RH, DWENGER A, et al. Vascular release of superoxide radicals is enhanced in hypercholesterolemic rabbits. **J Cardiovasc Pharmacol.** 1994, 24: 994–998.

MÜLLER C. Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. **Acta Med Scand.** 1938, 89:75-84.

MUSKHELISHVILI L, HART RW, TURTURRO A, et al. Age-related changes in the intrinsic rate of apoptosis in livers of diet-restricted and ad libitum-fed B6C3F1 mice. **Am J Pathol.** 1995,147(1):20-4.

NACITARHAN S, OZBEN T, TUNCER N. Serum and urine malondialdehyde levels in NIDDM patients with and without hyperlipidemia. **Free Radic Biol Med.** 1995, 19 (6), 893-6.

NAKA K, MURAGUCHI T, HOSHII T, et al. Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. **Antioxid Redox Signal.** 2008,10(11):1883-94.

NAKASHIMA Y, PLUMP AS, RAINES EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arterioscler Thromb.** 1994,14(1):133-40.

NAPOLI C, DE NIGRIS F, PALINSKI W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. **J Cell Biochem.** 2001, 82(4):674-82.

NASCIMENTO, João Fernando Cezar Gonçalves. **Correlações clínico patológicas da causa de morte no envelhecimento: um estudo de autópsias na cidade de São Paulo.** Tese de Doutorado. Faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

NASEEM SM, HEALD FP. Cytotoxicity of cholesterol oxides and their effects on cholesterol metabolism in cultured human aortic smooth muscle cells. **Biochem Int.**1987,14(1):71-84.

NEWBY AC, GEORGE SJ. Proliferation, migration, matrix turnover and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft cells. **Curr Opin Cardiol.** 1996, 11:574–582.

NEUZIL J, CHRISTISON JK, IHEANACHO E, et al. Radical-induced lipoprotein and plasma lipid oxidation in normal and apolipoprotein E gene knockout (apoE^{-/-}) mice: apoE^{-/-} mouse as a model for testing the role of tocopherol-mediated

peroxidation in atherogenesis. **J Lipid Res.** 1998, 39(2):354-68.

NIGRO P, SATOH K, O'DELL MR, et al. Cyclophilin A is an inflammatory mediator that promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **J Exp Med.** 2011,208(1):53-66.

NEVITT T, RODRIGUES POUSADA, C. The Stress Response in the Budding Yeast, **Res Signpost.** 2007, 39- 58.

NISHIO E, ARIMURA S, WATANABE Y. Oxidized LDL induces apoptosis in cultured smooth muscle cells: a possible role for 7-ketocholesterol. **Biochem Biophys Res Commun.** 1996, 223:413-418.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia.** 2.ed. São Paulo: Atheneu ed., p.37-54, 2003.

OGRUNC M, D'ADDA DI FAGAGNA F. Never-ageing cellular senescence. **Eur J Cancer.** 2011, 47(11):1616-22.

OHARA Y, PETERSON TE, HARRISON DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. **J Clin Invest.** 1993, 91(6):2546-51.

Organização Mundial de Saúde. Estatísticas sobre saúde Mundial de 2012. Disponível em: <www.who.int/healthinfo/EN_WHS2012_Full.pdf> Acesso em: 12 dezembro 2012.

Organização Pan-Americana de Saúde. Situação da saúde nas Américas – Indicadores Básicos. 2011. Disponível em: <ais.paho.org/chi/brochures/.../BI_2011_ENG.pdf> Acesso em: 01 dezembro 2012.

OSTLING O, JOHANSON KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1984, 123: 291-98.

PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev.** 2007, 87: 315-424.

PAGANO PJ, ITO Y, TORNHEIM K, et al. An NADPH oxidase superoxide-generating system in the rabbit aorta. **Am J Physiol.** 1995, 268(6 Pt 2):H2274-80.

PALMA PF, BAGGIO GL, SPADA C, et al. Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. **Braz J Infect Dis.** 2008, 12(2):108-14.

PALINSKI W, ORD VA, PLUMP AS, et al. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. **Arterioscler Thromb.** 1994,14(4):605-16.

PAPAHARALAMBUS CA, GRIENGLING KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. **Trends Cardiovasc Med.** 2007,17(2):48-54.

PAOLETTI R, GOTTO AM JR, HAJJAR DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. **Circulation.** 2004, 109(23):III20-6.

PARAVICINI TM, TOUYZ RM. NADPH oxidase, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care.** 2008, 31: S170-S180.

PARMAR K, MAUCH P, VERGILIO JA, et al. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2007,104(13):5431-6.

PANSARASA O, BERTORELLI L, VECCHIET J, et al. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. **Free Radic Biol Med.** 1999, 27(5-6):617-22.

PARAVICINI TM, TOUYZ RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes Care**. 2008;31(2):S170-80.

PECOITS-FILHO R, STEVINKEL P, LINDHOLM B, et al. Malnutrition, inflammation, and atherosclerosis (MIA syndrome) in chronic renal failure patients. **J Bras Nefrol**. 2002, 24(3):136-46.

PELED-KAMAR M, LOTEM J, OKON E, et al. Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for Down syndrome. **EMBO J**. 1995, 14(20):4985-93.

PENDSE AA, ARBONES-MAINAR JM, JOHNSON LA, et al. Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. **J Lipid Res**. 2009, 50:S178-82.

PEPPA M, URIBARRI J, VLASSARA H. Aging and glycoxidant stress. **Hormones**. 2008, 7(2):123-132.

PEREIRA TM, NOGUEIRA BV, LIMA LC, et al. Cardiac and vascular changes in elderly atherosclerotic mice: the influence of gender. **Lipids Health Dis**. 2010, 9:87.

PÉREZ VI, BOKOV A, VAN REMMEN H, et al. Is the oxidative stress theory of aging dead? **Biochim Biophys Acta**. 2009,1790(10):1005-14.

PERNOMIAN, Laena. **Efeitos vasculares induzidos pelo peptídeo natriurético tipo C em aorta de ratos normotensos e hipertensos renais**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. São Paulo. 2011.

PICCOLI C, RIA R, SCRIMA R, et al. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem

cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity. **J Biol Chem.** 2005, 280(28):26467-76.

PIEDRAHITA JA, ZHANG SH, HAGAMAN JR, et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1992, 89(10):4471-5.

PIERCE GB, PARCHEMENT RE, LEWELLYN AL. Hydrogen peroxide as a mediator of programmed cell death in the blastocyst. **Differentiation.** 1991, 46: 181–186.

PLUMP AS, SMITH JD, HAYEK T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell.** 1992, 71(2):343-53.

PODMORE ID, GRIFFITHS HR, HERBERT KE, et al. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. **Nature.** 1998, 392:559

POLLMAN MJ, HALL JL, GIBBONS GH. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. **Circ Res.** 1999, 84:113–121.

PORTO, Marcella Leite. **A terapia com células mononucleares atenua a aterosclerose em camundongos ApoE-KO.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. Espírito Santo. 2011.

QIANG L, WU C, MING M, et al. Autophagy controls p38 activation to promote cell survival under genotoxic stress. **J Biol Chem.** 2012.

RABELO LA., SOUZA VN, FONSECA LJ, et al. Redox Unbalance: NADPH Oxidase as Therapeutic Target in Blood Pressure Control. **Arq Bras Cardiol.** 2010, 94(5):684-693.

RADER DJ, DAUGHERTY A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. **Nature.** 2008, 451:904-913.

RADER DJ, WILSON JM. Gene therapy for lipid disorders. *Molecular cardiovascular medicine*. New York: Scientific american, 1995, p.97-114.

Rede Interagencial de informações para saúde. Indicadores básicos de saúde no Brasil: conceitos e aplicações. Rede Interagencial de informações para saúde – RIPSA. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 2002. 299p.

Rede Interagencial de Informações para Saúde. Informe de situação e tendências : demografia e saúde. Rede Interagencial de Informações para Saúde. Brasília. Organização Pan-Americana da Saúde, 2009. 36 p. Série G. Estatística e Informação em Saúde. 2009. Em: <http://www.ripsa.org.br/php/level.php?lang=pt&component=68&item=4>. Acesso em: 12 dezembro 2012.

REDDICK RL, ZHANG SH, MAEDA N. Atherosclerosis in mice lacking apo E: evaluation of lesional development and progression. **Arterioscler Thromb**. 1994, 14:141–147.

REN Y, WU H, MA Y, et al. Isolation, cultivation and identification of adipose-derived stem cell in bovines. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**. 2010, 26(12):1645-51.

RIBEIRO SM, QUEIROZ JH, PELUZO MC, COSTA NM, MATTA SL, QUEIROZ ML. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. **Biosci. J**. 2005, 21.(3) 133-149.

ROJAS A, FIGUEROA H, MORALES MA, et al. Facing up the ROS labyrinth-- Where to go? **Curr Vasc Pharmacol**. 2006, 4(3):277-89.

ROSS R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. **Nature**. 1993, 362: 801-809.

ROSS R. Atherosclerosis -- An Inflammatory Disease. **N Engl J Med**. 1999, 340:115- 126.

RÖSSIG L, DIMMELER S, ZEIHNER AM. Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. **Basic Res Cardiol.** 2001, 96: 11- 22.

RÖSSIG L, HOFFMANN J, HUGEL B, et al. Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. **Circulation.** 2001, 104(18):2182-7.

RYTER SW, TYRRELL RM. Singlet molecular oxygen (O₂): a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Radic Biol Med.** 1998, 24(9):1520-34.

SALMINEN A, KAUPPINEN A, SUURONEN T, et al. ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. **J Neuroinflammation.** 2009, 6:41.

SALMINEN A, KAARNIRANTA K. NF-kappaB signaling in the aging process. **J Clin Immunol.** 2009, 29(4):397-405.

SANDERSON KJ, VAN RIJ AM, WADE CR, et al. Lipid peroxidation of circulating low density lipoproteins with age, smoking and in peripheral vascular disease. **Atherosclerosis.** 1995,118(1):45-51.

.

SANZ J, FAYAD ZA. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nature.** 2008, 451(7181):953-7.

SARASTE A, PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res.** 2000, 45:528-37.

SARDINA JL, LÓPEZ-RUANO G, SÁNCHEZ-SÁNCHEZ B, et al. Reactive oxygen species: are they important for haematopoiesis? **Crit Rev Oncol Hematol.** 2012,81(3):257-74.

.

SARETZKI G, ARMSTRONG L, LEAKE A, et al. Stress defense in murine embryonic stem cells is superior rto that of various differentiated murine cells. **Stem Cells.** 2004, 22:962–971.

SAUER H, WARTENBERG M, HESCHELER J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. **Cell Physiol Biochem.** 2001, 11(4):173-86.

SATOH M, ISHIKAWA Y, TAKAHASHI Y, et al. Association between oxidative DNA damage and telomere shortening in circulating endothelial progenitor cells obtained from metabolic syndrome patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis.** 2008,198(2):347-53.

SCHÄPPI MG, JAQUET V, BELLI DC, et al. Hyperinflammation in chronic granulomatous disease and anti-inflammatory role of the phagocyte NADPH oxidase. **Semin Immunopathol.** 2008; 30: 255-71.

SCHUYLER CA, TA NN, LI Y, et al. Insulin treatment attenuates diabetes-increased atherosclerotic intimal lesions and matrix metalloproteinase 9 expression in apolipoprotein E-deficient mice. **J Endocrinol.** 2011, 210(1):37-46.

SCHONBECK U, MACH F, SUKHOVA GK, et al. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. **Am J Pathol.** 2000,156:7-14.

SCOTT MD, LUBIN BH, ZUO L, KUYPERS FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J Lab Clin Med.** 1991; 118: 7-16.

Secretaria de Estado de Saúde do Espírito Santo. Serviço de verificação de óbitos. Disponível em:<
http://www.saude.es.gov.br/download/Estatistica_Obitos_2011_2012.pdf.
Acesso em: 11 novembro 2012.

SHEEHAN AL, CARRELL S, JOHNSON B, et al. Role for Nox1 NADPH Oxidase in Atherosclerosis. **Atherosclerosis.** 2011, 216(2): 321–326.

SINGH NN, RAMJI DP. The role of transforming growth factor-beta

in atherosclerosis. **Cytokine Growth Factor Rev.** 2006,17(6):487-99.

SCHÖNEICH C, VINER RI, FERRINGTON DA, et al. Age-related chemical modification of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase of the rat. **Mech Ageing Dev.** 1999,107(3):221-31.

SILVA WM, FERRARI CB. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. **Rev. bras. geriatr. gerontol.** 2011, 14(3):441-451.

SHI M, YANG H, MOTLEY ED, et al. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. **Am J Hypertens.** 2004,17(5):450-6.

SHIN SH, SONG HY, KIM MY, et al. Platelet-activating factor receptor mediates oxidized low density lipoprotein-induced migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Cell Physiol Biochem.** 2010, 26(4–5):689–698.

SIES. H. Oxidative Stress. London: Academic , 1985, 507 p.

STRÅLIN P, KARLSSON K, JOHANSSON BO, et al. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 1995,15(11):2032-6.

SIES H, SHAROV VS, KLOTZ LO, et al. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **J Biol Chem.** 1997, 272(44):27812-7.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. 1985. London: Academic Press. pp. 1–7.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology.** 1997, 82:291-295.

SIES H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med.** 1991, 91(3C):31S-38S.

SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.** 1988, 175:184–191.

SIVONOVÁ M, TATARKOVÁ Z, DURACKOVÁ Z, et al. Relationship between antioxidant potential and oxidative damage to lipids, proteins and DNA in aged rats. **Physiol Res.** 2007, 56(6):757-64.

SHEEHAN AL, CARRELL S, JOHNSON B, et al. Role for Nox1 NADPH oxidase in atherosclerosis. **Atherosclerosis.** 2011, 216(2):321-6.

SLUPPHAUG G, KAVLI B, KROKAN HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat Res.** 2003, 531(1-2):231-51.

SOEDAMAH-MUTHU SS, STEHOUWER CD. Cardiovascular disease morbidity and mortality in patients with type 1 diabetes mellitus : management strategies. **Treat Endocrinol.** 2005, 4(2):75-86.

SOHAL RS, AGARWAL A, AGARWAL S. Simultaneous overexpression copper and zinc containing superoxide dismutase and catalase retards age related oxidative damage and increases metabolic potential in *Drosophila melanogaster*. **J Biol Chem.** 1995, 270: 15671-15674.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes rendus biologies.** 2004, 327(7):649-662.

SPITELLER G. Is lipid peroxidation of polyunsaturated acids the only source of free radicals that induce aging and age-related diseases? **Rejuvenation Res.** 2010, 13(1):91-103.

STOCKER R, KEANE JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev.** 2004, 84(4):1381-478.

STEFFENS S, MACH F. Inflammation and Atherosclerosis. **HERZ**. 2004, 29: 741-748.

STEINBERG D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. **Nat Med**. 2002, 8: 1211-1217.

STEINBERG D, PARTHASARATHY S, CAREW TE, et al. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. **N Engl J Med**. 1989,320(14):915-24.

STADTMAN ER. Protein oxidation and aging. **Free Radic Res**. 2006, 40(12):1250-8.

STAPLETON PA, GOODWILL AG, JAMES ME, et al. Altered mechanisms of endothelium-dependent dilation in skeletal muscle arterioles with genetic hypercholesterolemia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 2007, 293(3):R1110-9.

STARY HC, CHANDLER AB, DINSMORE RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 1995,15(9):1512-31.

STEFFENS AA. Epidemiologia das doenças cardiovasculares. **Rev. Soc. Bras. Cardiol**. Rio Grande do Sul. 2003, 12(3):5-15.

STEINBERG, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **J. Biol. Chem**. 1997, 272: 20963-20966.

STEINBRECHER UP, PARTHASARATHY S, LEAKE DS, et al. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1984,81(12):3883-7.

STOCKER R, HUANG A, JERANIAN E, et al. Hypochlorous acid impairs endothelium-derived nitric oxide bioactivity through a superoxide-dependent mechanism. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2004, 24: 2028-33.

STRALIN P, KARLSSON K, JOHANSSON BO, et al. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 1995,15(11):2032-6.

SORESCU D, WEISS D, LASSEÈGUE B, et al. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. **Circulation.** 2002, 105(12):1429-35.

SU Z, LI Y, JAMES JC, et al. Genetic linkage of hyperglycemia, body weight and serum amyloid-P in an intercross between C57BL/6 and C3H apolipoprotein E-deficient mice. **Hum Mol Genet .** 2006, 15(10):1650-1658.

SUDA T, ARAI F, HIRAO A. Hematopoietic stem cells and their niche. **Trends Immunol.** 2005, 26:426-433.

SUDA T, ARAI F, SHIMMURA S. Regulation of stem cells in the niche. **Cornea.** 2005, 24:S12-S17.

STOUT RW. Hyperinsulinemia and atherosclerosis. **Diabetes.** 1996, 45(3):S45–S46.

SWAIN U, SUBBA RK. Study of DNA damage via the comet assay and base excision repair activities in rat brain neurons and astrocytes during aging. **Mech Ageing Dev.** 2011, 132(8-9):374-81.

TABAS I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress. **Antioxid Redox Signal.** 2009,11(9):2333-9.

TANIYAMA Y, GRIENGLING KK. Reactive oxygen species in the vasculature:

molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**. 2003, 42: 1075-81.

TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, et al. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**. 2000, 35: 206-21.

TOUSOULIS D, BRIASOULIS A, VOGIATZI G, et al. Infusion of lin-/sca-1+ and endothelial progenitor cells improves proinflammatory and oxidative stress markers in atherosclerotic mice. **Int J Cardiol**. 2012.

TOUYZ RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?. **Hypertension**. 2004, 44(3):248-52.

TORZEWSKI M, OCHSENHIRT V, KLESCHYOV AL, et al. Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 2007, 27(4):850-7.

TOTHOVA Z, KOLLIPARA R, HUNTLY BJ, et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. **Cell**. 2007, 128(2):325-39.

TRESCASES NT, VOGHEL G, FARHAT N, et al. Âge et stress oxydant Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. **Medecine/sciences**. 2010, 26:875-80.

TRIPATHY D, MOHANTY P, DHINDSA S, et al. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. **Diabetes**. 2003, 52(12):2882-7.

TURRENS JF. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci.Rep**. 1997, 17: 3–8.

TURGEON J, HADDAD P, DUSSAULT S, et al. Protection against vascular

aging in Nox2-deficient mice: Impact on endothelial progenitor cells and reparative neovascularization. **Atherosclerosis**. 2012, 223(1):122-9.

TURRENS JF, BOVERIS A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem J**. 1980, 191: 421–427.

UNGVARI Z, BUFFENSTEIN R, AUSTAD SN et al. Oxidative stress in vascular senescence: lessons from success fully aging species. **Front Biosci**. 2008, 13: 5056–5070.

UNGVARI Z, CSISZAR A, KALEY G. Vascular inflammation in aging. **Herz**. 2004, 29:733–740.

UNGVARI Z., KALEY G, DECABO R, et al. Mechanisms of vascular aging: new perspectives. **J. Gerontol.ABiol.Sci. Med.Sci**. 2010a, 65:1028–1041.

UNGVARI Z, SONNTAG WE, CSISZAR A. Mitochondria and aging in the vascular system. **J. Mol.Med**. 2010b, 88:1021–1027.

URAO N, USHIO-FUKAI M. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche. **Free Radic Biol Med**. 2012, 54C:26-39.

URAO N, INOMATA H, RAZVI M, et al. Role of nox2-based NADPH oxidase in bone marrow and progenitor cell function involved in neovascularization induced by hindlimb ischemia. **Circ Res**. 2008, 103(2):212-20.

VAN CRUCHTEN S, VAN DEN BROECK W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat Histol Embryol**. 2002, 31(4):214-23.

VASCONCELOS SML, GOULART MOF, MOURA JBF, et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**. 2007, 30(5):1323-1338.

VASQUEZ EC, PEOTTA VA, GAVA AL, et al. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. **J Biomed Sci.** 2012, 13:19-22.

VERONICA G, ESTHER RR. Aging, metabolic syndrome and the heart. **Aging Dis.** 2012, 3(3):269-79.

VILLENEUVE N, FORTUNO A, SAUVAGE M, et al. Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. **J Vasc Res.** 2003,40(2):87-96.

VIÑA J, SASTRE J, PALLARDÓ FV, et al. Role of mitochondrial oxidative stress to explain the different longevity between genders:protective effect of estrogens. **Free Radic Res.** 2006, 40(12):1359-65.

VIRCHOW R. Die Cellularpathologie: Sechszehnte verlesung. **George Olms,** Hildesheim, Germany, 1966:317–329.

VIVEKANANTHAN DP, PENN MS, SAPP SK, et al. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. **Lancet.** 2003, 361:2017–2023.

WANG JC, BENNETT M. Aging and atherosclerosis: mechanisms, functional consequences, and potential therapeutics for cellular senescence. **Circ Res.** 2012, 111(2):245-59.

WARNHOLTZ A, NICKENIG G, SCHULZ E, et al.Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation.* 1999, 99(15):2027-33.

WEBER C, ZERNECKE A, LIBBY P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. **Nat Rev Immunol.** 2008,8(10):802-15.

WIKLUND O, BJÖRNHEDEN T, OLOFSSON SO, et al. Influx and cellular degradation of low density lipoproteins in rabbit aorta determined in an in vitro perfusion system. **Arteriosclerosis**. 1987, 7(6):565-71.

WILSON A, TRUMPP A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nat Rev Immunol**. 2006,6(2):93-106.

WILLIAMS KJ, VALLABHAJOSULA S, RAHMAN IU, et al. Low density lipoprotein receptor-independent hepatic uptake of a synthetic, cholesterol-scavenging lipoprotein: implications for the treatment of receptor-deficient atherosclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1988, 85(1):242-6.

WIKLUND O, WITZTUM JL, CAREW TE, et al. Turnover and tissue sites of degradation of glucosylated low density lipoprotein in normal and immunized rabbits. **J Lipid Res**. 1987, 28(9):1098-109.

WITZTUM JL, STEINBERG D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? **Trends Cardiovasc Med**. 2001, 11(3-4):93-102.

WOSNIAK, João. **Influência de lesão do DNA mitocondrial na atividade e expressão de NAD(P)H oxidase da membrana celular em células musculares lisas vasculares**. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

World Health Statistics 2012. World Health Organization.

YAGHOUBI M, OLIVER-KRASINSKI J, CAYATTE AJ, et al. Decreased sensitivity to nitric oxide in the aorta of severely hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. **J Cardiovasc Pharmacol**. 2000, 36(6):751-7.

YANG H, MOHAMED AS, ZHOU SH. Oxidized low density lipoprotein, stem cells, and atherosclerosis. **Lipids Health Dis**. 2012,11:85.

YANG H, ROBERTS LJ, SHI MJ, et al. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. **Circ Res.** 2004,95(11):1075-81.

YANG Z, KLIONSKY DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. **Nat Cell Biol.** 2010, 12:814-22.

YIN T, LI L. The stem cell niches in bone. **J Clin Invest.** 2006, 116(5):1195-201.

YU SP, CHOI DW. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2000, 97:9360-362.

YU J, LI Y, LI M, et al. Oxidized low density lipoprotein-induced transdifferentiation of bone marrow-derived smooth muscle-like cells into foam-like cells in vitro. **Int J Exp Pathol.** 2010, 91(1):24–33.

XU B, CHEN S, LUO Y, et al. Calcium signaling is involved in cadmium-induced neuronal apoptosis via induction of reactive oxygen species and activation of MAPK/mTOR network. **PLoS One.** 2011, 6(4):e19052.

XU P, COSTA-GONÇALVES AC, TODIRAS M, et al. Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in mas gene-deleted mice. **Hypertension.** 2008, 51: 574-80.

ZHANG SH, REDDICK RL, PIEDRAHITA JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. **Science.** 1992, 258(5081):468-71.

ZHU S, CAO L, YU Y, et al. Inhibiting autophagy potentiates the anticancer activity of IFN1 α / IFN α in chronic myeloid leukemia cells. **Autophagy.** 2012, 9(3).

ZIEMAN S, KASS D. Advanced glycation end product cross-linking:

pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease.

Congest Heart Fail. 2004, 10:144 –149.